

Produção *in vitro* de embriões bovinos

In vitro embryo production in cattle

Patrícia Fernanda PEIXER [1](#); Klayto José Gonçalves dos SANTOS [2](#); Aracele Pinheiro Pales dos SANTOS [3](#); Clarice BACKES [4](#); Jaqueline Ferreira Daniel SANTOS [5](#); Camila da Silva CASTRO [6](#)

Recebido: 11/12/2017 • Aprovado: 10/01/2018

Conteúdo

[1. Introdução](#)

[2. Revisão de Literatura](#)

[3. Considerações Finais](#)

[Referências bibliográficas](#)

RESUMO:

A produção *in vitro* de embriões (PIVe) é uma biotécnica importante para melhorar o potencial genético de fêmeas bovinas, sendo utilizada em escala comercial no Brasil e no mundo. A PIVE envolve etapas de coleta, maturação, fecundação e cultivo *in vitro* sendo que a maturação é a etapa determinante do sucesso na PIVE. Portanto, o objetivo desta revisão foi descrever os passos da PIVE, os critérios de avaliação e classificação da qualidade dos oócitos e embriões, e os desafios.

Palavras-Chave: Biotécnica reprodutiva. Desafios, Fertilização *in vitro*.

ABSTRACT:

The *in vitro* embryo production (IVP) is an important tool to improve the genetic potential of cows and has been used on a commercial scale in Brazil and worldwide. The IVP technique involves steps of collecting, maturation, fertilization and *in vitro* culture and maturation is the decisive step of success in IVP. Therefore, the objective of this review was to describe the steps of the IVP, the criteria for evaluation and classification of the quality of oocytes and embryos, and the challenges.

Keywords: Reproductive biotechnology. Challenges. *In vitro* fertilization.

1. Introdução

A Produção *In Vitro* de Embriões (PIVe) é uma técnica que vem se estabelecendo no mundo todo, e principalmente no Brasil, onde iniciou-se comercialmente em 1998, em um projeto conjunto entre a GERTEC Embriões, Unesp-Jaboticabal/SP e Beabisa Agricultura (BUENO e BELTRAN, 2008; ARRUDA et al., 2006).

A PIVE é uma biotécnica reprodutiva de enorme importância, pois permite o contato entre o espermatozoide e oócito fora do trato reprodutivo da fêmea, com a formação de um novo indivíduo (GONÇALVES et al., 2008). Envolve etapas de coleta dos oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo ou co-cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e embriões fora do útero animal (VARAGO et al., 2008).

No Brasil, a PIVE se tornou a principal ferramenta utilizada pelos criadores (VIANA e CAMARGO, 2007) por ser a biotécnica de eleição para maximizar a quantidade de descendentes dos melhores animais e acelerar o progresso genético dos rebanhos, a PIVE associada à aspiração folicular guiada por ultrassom, da sigla inglesa *ovum pick-up* (OPU), viabiliza o aproveitamento de animais bastante jovens e diminuindo o intervalo de gerações,

produzir novilhas de reposição apenas de animais superiores, seleção de matrizes (VARAGO et al., 2008),

Adiante disso, a PIVe vem possibilitando vários benefícios para a reprodução animal em setores científicos, produtivos e tecnológicos (DE BEM et al., 2014; MACHADO et al., 2012), sendo desenvolvidas a fim de propiciar condições mais adequadas na MIV de complexos cumulus-oócito (CCOs), capacitação espermática seguida de FIV, e evolução embrionário *in vitro* (VARAGO et al., 2008).

O objetivo da PIVe consiste em obter embriões viáveis de fêmeas saudáveis de alto valor genético e também aquelas que não estão mais aptas a produzirem descendentes pelas técnicas convencionais. Além disso, fêmeas a partir dos seis meses de idade, gestantes até o terceiro mês ou no período pós-parto podem ser usadas como doadoras de oócitos na PIVe (BUENO e BELTRAN, 2008).

Entre as dificuldades desta técnica está o custo elevado, em função da necessidade de infraestrutura laboratorial, a inconsistência dos resultados referentes à taxa de mórulas e blastocistos e o tempo consumido para executar a rotina de PIVe, que vai desde a OPU o a evolução *in vitro* de embriões (MIRANDA et al., 2007).

O objetivo da realização deste trabalho foi descrever a os passos da PIVe, apresentando as etapas de avaliação, classificação e os desafios futuros.

2. Revisão de Literatura

2.1. Aspiração folicular guiado por ultrassom

A OPU tem função de obter material biológico de animais com elevado mérito genético (VEGA et al., 2015). Esta técnica é importante por aumentar a criação de animais geneticamente excelentes, espalhando sua progênie de forma mais rápida. A técnica consiste na coleta de CCOs com o ajuda de ultrassom para guiar o processo de aspiração em animais vivos, através da punção folicular ovariana (STROEBECH et al., 2015; PONTES, 2009).

A OPU foi elaborada, primeiramente na década de 80, o que impulsionou a PIVe no mundo, recusando assim o método cirúrgico (VIANA e BOLS, 2005).

Os oócitos aspirados do centro dos folículos são de diâmetro de dois a oito mm, menores de dois mm não sendo eficientes para recomeçar a meiose e os maiores de oito mm normalmente se deparam em progresso de atresia ou maturação. Os dois tipos a viabilidade são prejudicados (GONÇALVES et al., 2008).

GORDON (2003) relata a vantagem da OPU, na questão de rapidez de operação, se tornando importante em laboratórios de PIVe, portanto é importante considerar a qualidade, há pouco mérito na rapidez dos procedimentos quando resulta em COCs de qualidade inferior.

VIEIRA et al. (2014) criaram uma técnica de superestimulação hormonal para maximalizar o número de CCOs recuperados, que faz uso de protocolo de sete dias com FSH/LH aumentando o número de folículos, além de melhorar os índices de blastocistos e agregar a formação de embriões.

Segundo ANTONIOLLI (2005) os oócitos se mantêm paralisados dentro do folículo em consequência dos fatores inibitórios não conhecidos. Após serem retirados do interior do folículo, estes oócitos meioticamente eficazes reiniciam naturalmente o progresso de meiose, da qual uma parte desse não adquire a capacidade citoplasmática (BARRETTO, 2007).

Os oócitos puncionados de folículos menores que um mm de diâmetro podem reiniciar a meiose quando CIV, porém, somente oócitos obtidos de folículos maiores que dois mm são aptos de atingir o estágio de metáfase II (BARRETTO, 2007).

SIRARD et al. (2006) afirma que a eficiência de suportar os primeiros sete dias de evolução embrionário é claramente influenciada pela situação folicular a partir do qual o oócito é obtido.

2. 1. 1. Seleção dos oócitos

Os oócitos possuem seu potencial de MIV, FIV e crescimento embrionário estimado através da aparência das CCOs, sendo classificados de acordo com a morfologia na tentativa de identificar os de maior viabilidade. Segundo GONÇALVES et al, (2008) essa classificação possui escala de um a quatro:

Qualidade 1: Apresenta-se com CCOs envoltas em mais de três camadas, com citoplasma homogêneo, com granulações finais, preenchendo completamente o interior da zona pelúcida (ZP) e de coloração marrom. Qualidade 2: As CCOs encontram-se parcialmente compactadas, em menos de três camadas celulares. O citoplasma é com granulações distribuídas de maneira heterogênea, podendo estar mais concentradas em determinados locais, também preenche completamente a ZP. Qualidade 3: As CCOs demonstram-se presentes, porém expandidas. O ooplasma fica contraído, degenerado, vacuolizado ou fragmentado, preenchendo irregularmente a ZP. Qualidade 4: Ausência de CCOs apresentando-se desnudo.

Segundo PALMA (2008), os efeitos benéficos das CCOs sobre a fecundação são aumento do número de espermatozóides fecundantes ao redor do oócito; estabelecer um microambiente que facilita a capacitação espermática e penetração; proteger o oócito do endurecimento prematuro da ZP.

O CCOs é um sistema em que organiza as células junto com o oócito, dando suporte e nutrição ao oócito, através de substratos e nutrientes, sendo de enorme importância durante o seu crescimento e evolução, e durante a MIV e FIV (SUTTON-MCDOWALL e THOMPSON, 2015).

2.2. Maturação *in vitro*

O começo da meiose *in vitro* ocorre naturalmente no instante que o oócito é desunido do folículo não ovulatório (2-8 mm) e compreende a metáfase II em 18- 24 horas de CIV (PALMA, 2008; WRENZYCKI, 2016). O motivo que inibe a maturação oócitaria está presente no folículo, pois este limita com a retirada do oócito do ambiente folicular e inicia seu desenvolvimento (VARAGO et al., 2008).

A maturação compreende transformação nuclear, citoplasmáticas e molecular, estando ligadas a mudanças estruturais e bioquímicas, fazendo com que a célula reprodutiva feminina se torne capaz de ser fecundado e a concluir sua evolução embrionário (GONÇALVES et al., 2008; DICKINSON et al., 2016). A maturação concede o oócito de expressar seu mais alto potencial de evolução após a fecundação (BARRETTO, 2007).

Dentre as alterações nucleares: quebra da vesícula germinativa (GVBD), desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico, e dentre as alterações citoplasmáticas: redistribuição das organelas intracelulares (mitocôndrias migram para posição perinuclear e grânulos corticais depositam-se abaixo da membrana vitelina) e a do mecanismo de liberação de cálcio (Ca^{2+}) (BARRETTO, 2007).

O oócito avança para metáfase, anáfase I (AI) e telófase I (TI), momento que ocorre a expulsão do primeiro corpúsculo polar. A evolução vai parar em metáfase II (MII), a finalização da meiose ocorre então com a penetração do espermatozóide, ou seja, com a fecundação ocorre a ativação oócitaria que é acompanhada pela expulsão do segundo corpúsculo polar para o espaço perivitelinico (VARAGO et al., 2008).

Para concluir a primeira divisão meiótica *in vitro* o tempo vai variar de 18-24 horas (CHAVES et al., 2010), acontecendo primeiramente o rompimento da vesícula germinativa, sobrevivendo entre 7 e 12 horas após o início do cultivo, porém a metáfase I (MI) ocorre entre 12 e 15 horas. A anáfase I e a telófase I sucede entre 15 e 18 horas e a metáfase II (MII) após as 18 horas, 95% dos oócitos ou mais apresentam bloqueio em MII entre 22 a 24 horas de CIV (BERTAGNOLLI et al., 2004).

Na retomada da meiose é possível observar no microscópio que o primeiro sinal é a dissolução da membrana nuclear, expulsão do primeiro corpúsculo polar e a criação do segundo fuso meiótico depois de ocorrer o sazonalamento do oócito e expansão das células do

cumulus (GORDON, 2003). A expansão CCOs na superfície do oócito indica e coincide com a retomada da meiose (BARRETTO, 2007), onde normalmente após esse marco é removida por uma pipeta para a realização da fertilização (MENCHACA et al., 2016; AMINI et al., 2016; ROOVER et al., 2007).

As células ao redor do oócito, que são conhecidas como células da granulosa, é que formam o CCOs (GONÇALVES et al., 2008), são relevantes para assegurar ao oócito sua completa maturação, sob as conjunções de CIV em laboratório, sendo avaliadas as características morfológicas para o processo seguinte (GORDON, 2003; AMINI et al., 2016).

As células do *cumulus* expressam importantes funções no crescimento no decorrer da maturação, divisão meiótica e na maturação citoplasmática do oócito. Essas CCOs, exceto as do mural, tornam-se suspensas em uma matriz de muco enquanto a maturação, permanecendo separadas em consequência do acúmulo desse muco o qual é rico em ácido hialurônico, esse ácido sintetizado pelas células do próprio *cumulus* induzem sua expansão ou mucificação no decorrer da maturação (GONÇALVES et al., 2008).

A primeira alteração visível ao microscópio é a ruptura da vesícula germinativa. A última expressão da maturação nuclear coincide com o final da meiose e presença de dois corpúsculos polares (PALMA, 2008).

Depois de maturados, permanecem em metáfase II até a fecundação, por causa de razões citostáticos (CSF) (BETAGNOLLI et al., 2004). Após a finalização da maturação nuclear e citoplasmática, estará competente para ser fecundado e para a evolução do crescimento embrionário (GEBREMEDHN et al., 2016). Uma maturação incompleta, tanto nuclear como citoplasmática, impede a fecundação e aumenta caso de polispermia, de partenogênese e bloqueia o crescimento embrionário (VARAGO et al., 2008).

Segundo PALMA (2008), dentre os motivos que acometem a MIV dos oócitos e desenvolvimento embrionário está a origem dos oócitos se são de folículos grandes ou pequenos, o estado cíclico do animal, estado nutricional; Condições de CIV.

2.2.1. Meios de cultivo e suplementação para MIV

Existem vários meios de maturação para a PIVE bovinos. Até os dias correntes, vários meios e formalidades estão sucedendo estudos e testados na MIV dos oócitos, como o Synthetic Oviductal Fluid - SOF, Ham's F-12 e o Tissue Culture Medium 199 (TCM 199®). Dessa forma, o TCM199® é o mais usual entre os laboratórios de PIVE, sendo na maioria das vezes, suplementado com soro fetal bovino (SFB), aminoácidos como L-glutamina, bicarbonato de sódio, FSH, LH, estradiol-17 β , piruvato de sódio, lactato, vitaminas e antibióticos (PALMA, 2008).

A suplementação com o FSH e o LH são essenciais, enquanto a suplementação de estrógenos nos meios MIV é opcional e varia conforme o laboratório (VARAGO et al., 2008). Os hormônios LH e FSH proporcionam uma melhor expansão nas células do *cumulus*, o FSH estimula a elaboração de estruturas sinalizadoras pelas células somáticas, que atraem a volta da meiose e, facilitando a fertilização (GOTTARDI e MINGOTI, 2009).

Os princípios proteicos de proveniência animal mais usuais nos meios de maturação são SFB e a albumina sérica bovino (BSA), esses complementos possuem componentes como fatores de desenvolvimento, aminoácidos e proteínas, as quais variam significativamente (VARAGO et al., 2008).

A desvantagem do uso de soro de vaca no estro (SVE) vem do fato da indefinição de sua composição, pois, o soro pode conter outras substâncias estimuladoras e/ou inibidoras da maturação dos oócitos, além disso, o seu uso dificulta o conhecimento exato da concentração hormonal empregada e os resultados podem ser influenciados pela partida do soro (COELHO et al., 2002).

Nos meios de cultura várias proteínas fazem parte da composição, desempenhando papel de grande importância, como: diminuir a embriotoxicidade do metabolismo embrionário, fonte nutritiva do embrião, fonte de crescimento, promove o desenvolvimento direta ou indiretamente do embrião através da proliferação das CCOs (ECKERT e NIEMANN, 1995).

Para se obter sucesso na MIV é necessário também que o meio esteja com o pH, a

osmolaridade e a composição iônica adequada (GONÇALVES et al., 2002). Portanto fora o meio, é necessário o uso de uma estufa que conserve a atmosfera gasosa e temperatura controlada e adequada, o período de maturação varia de 18 a 24 horas em atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008).

2.3. Fertilização *in vitro*

PALMA (2008) descreve a FIV como sendo a etapa em que os oócitos maduros são cultivados com os espermatozóides e fecundados, gerando posteriormente o zigoto, que evolui até o estágio de blastocisto (MELO et al., 2016).

Vários laboratórios utilizam sêmen congelado, porém após descongelar é preciso selecionar os espermatozóides vivos e aptos a fecundar (VARAGO et al., 2008).

Para o êxito da FIV esta requer o preparo adequado dos dois gametas, assim como meios de cultivo e condições favoráveis para que ocorra a fertilização (GORDON, 2003). Outros fatores podem afetar a taxa de fecundação tais como a dose de sêmen, a interação touro-vaca e a diferença entre touros na capacidade de fecundar e produzir embriões. A variação individual de touros é um dos principais fatores que interferem na FIV e produção de embriões (WATANABE et al., 1999; XU et al., 2006).

O processamento da FIV é realizado por um período de 18 a 22 horas, em temperatura de 38,5°C, atmosfera com 5% de CO₂ em ar e umidade a 95% (CORRÊA, 2006).

2.3.1. Capacitação espermática

Os espermatozóides de mamíferos após serem ejaculados não possuem eficiência para fecundação, mesmo encontrando-se móveis e apresentando morfologia aparentemente normal. O potencial de adquirir a competência para fecundar é denominada capacitação espermática. *In vivo*, a capacidade fecundante é completada quando o espermatozóide atinge o trato genital da fêmea (BALL e PETERS, 2004). Estando uma célula altamente especializada, o espermatozóide precisa se tornar capaz para fertilizar o oócito, para isso precisa sofrer uma série de modificações bioquímicas atingindo uma posição denominado capacitação (PONTES, 2009; FLAHERTY, 2015).

A capacitação provoca desestabilização da membrana plasmática dos espermatozóides pela remoção de algumas proteínas, sem modificações morfológicas, mas bioquímicas, resultando em uma hiperativação espermática (GONÇALVES et al., 2008). Hiperativação ou motilidade hiperativada, é definida como o padrão de movimento flagelar apresentado pelo espermatozóide no sítio de fertilização (GABALDI et al., 2002).

BALL e PETERS (2004), dizem que a capacitação espermática envolve mudanças e alterações enzimáticas e estruturais, principalmente na parte anterior do acrossoma e da membrana da cabeça do espermatozóide, tais alterações como o aumento na permeabilidade do cálcio, variações da estrutura da membrana, ativação da enzima adenilciclase, e mudanças de proteínas.

Com a finalidade de aumentar a atividade espermática e facilitar a penetração é comumente utilizada pelos laboratórios a adição de aminoácidos como a penicilina, hipotaurina e epinefrina (PHE) ao meio de capacitação, melhorando os índices de fecundação (PALMA, 2001; GONÇALVES et al., 2002).

Para que a capacitação ocorra é necessário a escolha e recuperação de espermatozoides viáveis para a FIV, afastando os espermatozoides viáveis dos inviáveis e do plasma seminal ou do diluente usado para congelamento, tendo-se um sêmen livre de contaminantes (HENKEL e SCHILL, 2003).

2.3.2. Método de separação espermática para a FIV

São empregados vários recursos de eliminação do plasma seminal e separação da fração móvel do sêmen diluído e descongelado, sendo as mais comuns para a preparação de espermatozoides o gradiente de Percoll® ou Swim-up (WRENZYCKI, 2016; FONSECA, 2010).

O procedimento ideal para separação espermática deve ser rápido, simples, de baixo custo, capaz de a maior parte dos espermatozoides móveis, não proceder em alterações espermáticas, remover substâncias tóxicas e bioativas, espermatozoides mortos e outras células, incluindo microorganismos, permitindo processar grandes volumes de sêmen, além de possibilitar o controle da concentração e volume final da suspensão espermática (MARTINEZ, 2007).

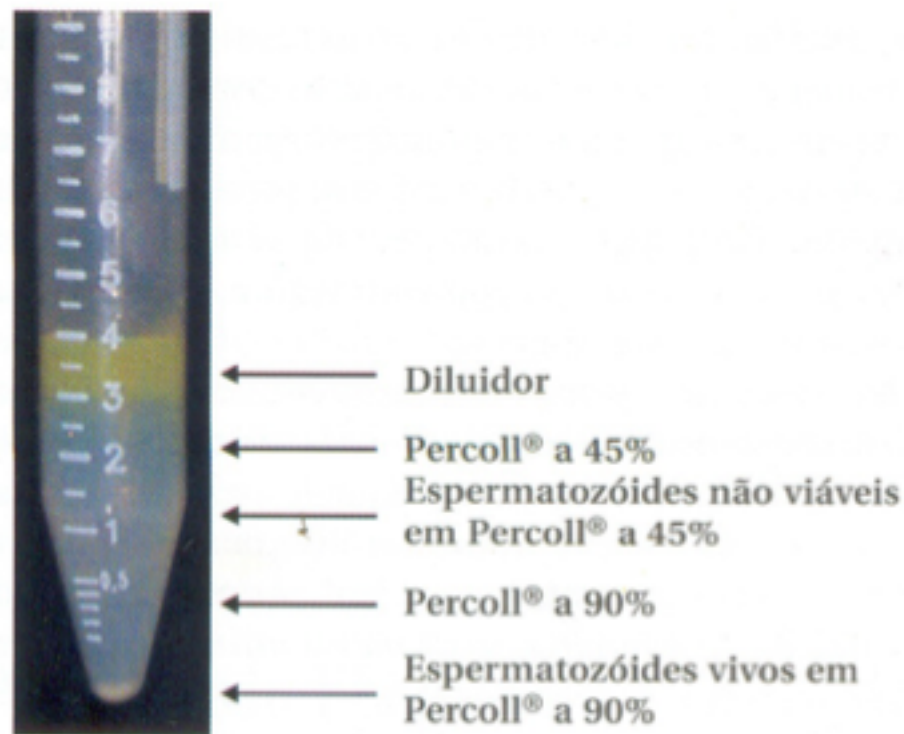
O gradiente de Percoll® proporciona maior recuperação de espermatozoides móveis quando comparado com o swim up, devido ao superior número de espermatozoides recuperados e maior motilidade espermática (PARRISH, 2014).

No processo de separação espermática com o Percoll®, é caracterizada pela centrifugação através de um gradiente de concentração, como uma mistura de Percoll® 45% sobre uma solução de 90%, como mostra na figura 1, para permitir a separação dos espermatozoides vivos dos demais constituintes do sêmen, baseado na diferença de densidade (WRENZYCKI, 2016; SILVA et al., 2009).

O Percoll® é constituído por partículas de sílica coloidal coberto com polivinilpirrolidona, preparado em diferentes concentrações para formar um gradiente necessário de separação espermática (GONÇALVES et al., 2002; GORDON, 2003).

Figura 1

Distribuição dos segmentos do sêmen nas diferentes camadas de Percoll®.



Fonte: Adaptado Gonçalves et al., 2008.

Talvez mais importante que a seleção dos espermatozoides seja a capacitação destas células, porque somente a célula espermática capacitada tem habilidade de ligar-se à ZP do oócito, pois somente ele consegue sofrer reação acrossômica (RA) (CORRÊA, 2006).

Após à seleção dos espermatozoides, são feitas as análises para definir a concentração espermática, que é avaliada com o objetivo de aferir a quantidade de espermatozoides vivos presentes em cada palheta e também é feito o teste de motilidade do espermatozoide, devendo sempre ser progressiva (GONÇALVES et al., 2008).

Segundo DIAS et al. (2006), a fecundação é realizada com os resultados a receber através do cálculo com fundamento na motilidade e na concentração espermática. A quantidade definida de espermatozoides é depositada em contato com os oócitos presentes em cada gota do meio FIV, que são cobertos com óleo mineral e logo em seguida colocados em estufa de CO₂, nas mesmas condições da maturação.

2.3.3. Meio de FIV

O meio de fertilização mais usualmente utilizados por vários laboratórios para FIV é o FERT-TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato), que é composto com elementos necessários para

estimular a capacitação espermática, como a heparina, afóra outros fatores marcantes para a motilidade progressiva e alicerce do gameta masculino (MELO et al., 2016).

A heparina é considerada um importante capacitador de espermatozóides (PARRISH, 2014). O meio pode ser ainda suplementado com PHE, para melhorar a porcentagem de capacitação do acrossoma do espermatozóide (KASSENS et al., 2015; MENCHACA et al., 2016). Hipotaurina com adrenalina são capazes de estabelecer a elaboração de superóxido que pode parar a peroxidação lipídica na célula espermática (GORDON, 2003).

A utilização da heparina para capacitar espermatozoides foi um marco histórico para PIVE (MOURA, 2016). Os elementos citados a cima fazem parte para que ocorra a interação do oócito e espermatozóide para a FIV (GORDON, 2003).

2.4. Cultivo *in vitro*

O CIV refere-se ao período de evolução do oócito fertilizado até o estágio de blastocisto, enquanto tal período sucede a ativação do genoma embrionário, divisão celular, compactação dos blastômeros, e início da distinção embrionária com a formação do blastocelo (BUENO e BELTRAN, 2008; LIMA e SOUZA, 2009), na qual, assim, podem ser transferidos para o útero de receptoras (DODE e RUMPF, 2002).

LIMA e SOUZA (2009) afirmam que o zigoto, estágio embrionário inicial, é dirente do estágio embrionário final, em termos de morfologia e características fisiológicas e bioquímicas. As alterações morfológicas que ocorrem no embrião inicialmente é a compactação dos blastômeros (mórula compacta) e o desenvolvimento da blastocelo (blastocisto inicial).

Para se conseguir taxas satisfatórias de crescimento embrionário é fundamental se manter as condições mais próximas possíveis encontradas na tuba uterina, que é onde o oócito fertilizado inicia a sua evolução, até chegar à fase de embrião (LIMA e SOUSA, 2009). O pH, oxigênio, hormônios e nutrientes devem encontrar-se presentes nas mesmas quantidades ou em quantidades próximas às do ambiente uterino (FIGUEIREDO, 2010; WRENZYCKI, 2016).

O CIV de embriões requer um conjunto de elementos que suporte a evolução embrionária. O co-cultivo com células somáticas era indispensável para se adquirir porcentuais aceitáveis de evolução embrionária. No entanto, com a evolução do meio SOF, que foi originado com base na elaboração do fluído do oviduto de bovinos, tornou-se excluída a utilização de co-cultivo nesse meio, os zigotos se expressam com agradáveis taxas sem o comparecimento de células somáticas (WATSON et al., 2000).

Estudos têm demonstrado, entretanto, que o meio SOF pode ser utilizado com alta tensão de oxigênio, desde que as CCOs remanescentes no zigoto após a FIV sejam mantidas (DODE e MATTOS, 2002). Esses resultados sugerem que as CCOs facilitariam o crescimento embrionário por retirarem substâncias tóxicas, diminuindo o estresse oxidativo. Condições de CIV normalmente aumentam a produção de radicais livres, pois os embriões estão mais expostos à luz e a altas concentrações de O₂, prejudicando a taxa de crescimento embrionário.

O estresse oxidativo proveniente de alta tensão de oxigênio (20%) causa retardo no desenvolvimento dos embriões em sistemas de CIV convencionais, devido à produção de peróxido de hidrogênio, que lesiona o DNA da célula, como relataram (TAKAHASHI et al., 2000). Para reduzir os efeitos do estresse oxidativo, utiliza-se a redução da tensão de O₂ nos sistemas de CIV, redução do tempo de manuseio sob a luz incandescente, uso de antioxidantes ao meio de cultivo (SILVA, 2010).

A diferença entre o ambiente *in vivo* e *in vitro* é a quantidade de oxigênio, visto que no oviduto e no útero é menor do que a utilizada nos sistemas de cultivo embrionário *in vitro*, tendo enorme influência na realização e na qualidade dos embriões (CHAVES et al., 2010).

Os embriões são capazes de se desenvolver em diferentes meios de cultura, desde simples soluções de sais balanceadas até sistemas complexos. O Tissue Culture Medium 199 é um meio de cultivo complexo desenvolvido para a preservação celular em geral, enquanto que o SOF é classificado como um meio simples, desenvolvido e direcionado para a criação de embriões (GONÇALVES et al., 2002).

WRENZYCKI et al. (2001) utilizaram os dois meios para CIV embrionário em bovinos e não encontraram diferenças nas taxas de clivagem, mórulas e blastocistos, porém sugeriram que o uso do SOF proporciona um ambiente mais adequado, pois existem diferenças no padrão de expressão de genes ligados à pré-implantação de embriões.

Os componentes que fazem parte do meio de cultivo interferem na produção e qualidade embrionária. Substâncias como lactato e piruvato são essenciais durante a fase de divisão e desenvolvimento inicial do embrião. A glicose, na presença de fosfato, atrasa ou para a evolução embrionária inicial, porém esse carboidrato é fundamental na fase de compactação e de blastocisto (PEREIRA, 2005).

As fontes proteicas mais utilizadas em sistemas de CIV são o soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA) (LONERGAN et al., 1999). Em consequências aos riscos que o uso do SFB apresenta para o CIV, pesquisas continuam, para substituir o SFB por outras substâncias que promova os mesmos resultados com relação as taxas de blastocistos. Atualmente, tem sido utilizado soro sintético suplementado com albumina sérica bovina (BSA) (STROEBECH et al., 2015). De outra forma é utilizado fluido sintético do oviduto (AMINI et al., 2016; KASSENS et al., 2015).

2.5. Classificação dos embriões

No processo de classificação leva-se em consideração o aspecto morfológico do embrião e as variações que ocorrem no mesmo durante seu desenvolvimento inicial. De acordo com HAFEZ et al. (2004), a classificação é realizada da seguinte maneira:

Mo – Mórula: Blastômeros individuais não- distintos, espaço perivitelino ocupado pelo embrião;

Mc – Mórula Compacta: Blastômeros individuais tornam-se mais próximos, formando uma massa embrionária compacta que ocupa dois terços do espaço perivitelino;

Bi – Blastocisto Inicial: Embrião com a cavidade preenchida com fluido ou blastocele, ocupando três quartos de espaço perivitelinico, trofoblasto e MCI podem ser diferenciadas;

Bl – Blastocisto: Pronunciada diferenciação do trofoblasto externo, MCI compacta e mais escura, blastocisto muito proeminente e embrião ocupando quase todo o espaço perivitelinico;

Bx – Blastocisto expandido: o embrião cresce notadamente em tamanho, a zona pelúcida torna-se mais fina;

Bn – Blastocisto em Eclosão: o embrião no processo de eclosão, zona pelúcida desprendida;

Be – Blastocisto Eclodido: o embrião reexpandido com blastocisto grande, circular, muito frágil e em estágios mais avançados, alongados;

Segundo MARTINEZ e SOUZA (2007), a qualidade dos embriões é avaliada pelo seu aspecto morfológico, estando relacionada com a viabilidade dos mesmos. Os principais parâmetros considerados para avaliação da qualidade são formato, simetria, coloração, extrusão celular e integridade da ZP.

2.6. Desafios e perspectivas da PIVe

A PIVe tem sido abundantemente utilizada, com a finalidade de melhor aproveitamento de animais com genética superior, a fêmea em condições fisiológicas, tem a produção de até 10 bezerros durante sua vida produtiva (LOIOLA, 2014). E por aspiração, é recuperado em média 30 oócitos viáveis, chegando a 2.880 oócitos viáveis por ano/animal, levando em conta as perdas na PIVe, 32,8% chegam a embriões e 33% desses embriões chegam à gestação, totalizando 944 embriões, e 311 gestações, possibilitando uma maior disseminação e exploração de uma genética com mérito (LOIOLA, 2014; WRENZYCKI, 2016).

O progresso da PIVe no Brasil é tão claro que só a América do Sul foi responsável por 72,7% em bovinos (IETS, 2014). E mundialmente a transferência de embriões e aspiração folicular

guiada por ultrassom teve um avanço 16,7%, comparado ao ano de 2013. O Brasil em particular, produziu 70,8% dos embriões de FIV no mundo durante o mesmo período (IETS, 2014). O Brasil ampliou mais de sete vezes a PIVE em bovinos entre 2001 (50.000 embriões) e 2013 (366.517 embriões) (KADARMIDEEN et al., 2015). Os atuais índices da PIVE retratam a competência do mercado brasileiro em programas de OPU e PIVE em larga escala (OIKAWA et al., 2016).

Os principais desafios encontrados são em diminuir as variações nos resultados, e padronizar os meios utilizados, aumentar o conhecimento a respeito da compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação genética durante as primeiras fases de evolução embrionária (VAN WAGTENDONK, 2006).

Tratando de uma técnica moderna, a fatores limitantes, como a distância do laboratório para a fazenda. Para resolver este obstáculo, LOIOLA et al. (2014) avaliaram um programa de PIVE com transporte por longo tempo, parte do CIV efetuou-se no transporte. Foi utilizado no estudo, um conjunto manejável de incubação, onde a maturação inteira ocorreu durante o transporte, dando início imediatamente após a coleta e cessando no instante em que chegou ao local da transferência, tendo assim resultados satisfatório nas taxas de produção de embrião e de gestação.

Outra alternativa, é o uso de bloqueadores meióticos que tem o intuito de ampliar o tempo de maturação citoplasmática e melhorar a capacitação oócitaria, é manuseada quando não se quer iniciar imediatamente o CIV dos oócitos (ADONA et al., 2008, GUEMRA et al., 2014). Para esse fim, tem sido utilizado roscovitina e a butirolactona que maximizam as taxas de blastocisto (MAZIERO et al., 2016).

As perdas embrionárias na fase pré- implantadas são comuns, apenas 50% dos embriões transferidos concebem gestação até o estágio final (MENCHACA et al., 2016). São de diversas origens essas taxas e podem ser devido a impasses no próprio embrião ou no até mesmo no ambiente uterino. Considera -se que o principal gerador de mortalidade embrionária esteja associado a ocorrência de problemas de sinalização conceito-maternal, o que poderia favorecer o desenvolvimento assincronico do embrião (LIMA e SOUZA, 2009).

O rendimento da OPU está correlacionado a fatores técnicos, por exemplo o tipo e frequência do transdutor, à agulha utilizada na punção e a pressão de vácuo, e aos biológicos que que são a fase reprodutiva em que o animal se encontra, as terapias hormonais (GONÇALVES et al., 2002), o tamanho dos folículos (CASTILHO et al., 2007) além da raça dos animais.

No momento atual, uma novidade promissora é a avaliação da quantidade de hormônio anti-mülleriano (AMH) em bovinos, que está conectada com a quantidade e qualidade de CCOs recuperados, sendo capaz de ser utilizado para selecionar animais com maior potencial para uso na PIVE, aumentando o processo de ganho genético, tornando -se um marcador endócrino de reserva ovariana, em virtude de possibilitar a avaliação de animais jovens antes do amadurecimento sexual (GUERREIRO et al., 2014, VERNUNFT et al., 2015, BARUSELLI et al., 2015).

O AMH é utilizado para analisar o esgotamento ovariano da fêmea, constatado através do restringimento de sua concentração no sangue (SILVA et al., 2016), tendo potencial para estabelecer o tempo em que a fêmea já não é mais pertinente a PIVE.

Quase vinte anos após a utilização da OPU, permanecem os conceitos de ser ainda uma alternativa simples e aplicável, aumentando a obtenção repetida de oócitos destinados aos procedimentos *in vitro*. Vem se aprimorando a eficiência das aspirações cada vez mais para situações que exigem mais cautela do operador, por exemplo, como fêmeas gestantes e situações de infertilidade extra-ovariana, como aderências ovarianas e/ou uterinas (SENEDA et al., 2006).

3. Considerações Finais

Após o presente estudo entende-se que é fundamental que tanto o profissional do campo quanto do laboratório tenha um bom conhecimento, para garantir a qualidade e obter maiores índices de prenhes nos rebanhos, e deixar de lado qualquer tipo de inimizades entre

ambas as partes.

A PIVE é uma biotécnica que permite o criador obter resultados esperados, mas temos que levar em consideração que os embriões produzidos pela PIVE, ainda são de qualidades inferiores aos obtidos através da transferência de embriões, portanto, mais estudos são necessários para poder compreender melhor os fatores que influenciam a PIVE, e os efeitos dos fatores ligados aos meios utilizados nas etapas.

Particularmente, no meu ponto de vista é a única biotécnica capaz de chegar ao patamar de animais geneticamente superiores em curto espaço de tempo, mas muitos criadores ficam com receio de implantar na propriedade, por ser considerada ainda uma biotécnica cara, em relação a TE, IA, IATF.

É fundamental conhecer as etapas de avaliação e classificação dos embriões, para o sucesso e superação dos desafios futuros da PIVE.

Referências bibliográficas

- ADONA, P. R.; PIRES, P. R.; QUETGLAS, M. D.; SCHWARZ, K. R.; LEAL, C. L. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. **Anim Reprod Sci.**, v. 108, p. 49-65, 2008.
- AMINI, E. D. V. M.; ASADPOUR, R.; ROSHANGAR, L.; JAFARI-JOOZANIP, R. Effect of linoleic acid supplementation on *in vitro* maturation, embryo development and apoptotic related gene expression in ovine. **Reprod Bio Med**, v.14, p. 255-262, Tabriz, Irã, 2016
- ANTONIOLLI, C.B. **Produção *in vitro* de embriões bovinos utilizando diferentes condições de maturação oocitária**. 2005. f. 32. Tese, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F.C.; RAPHAEL, C. F.; PERES, K. **Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF E TETF**. 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina, PR, 2006
- BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. Fertilization, Conception and Pregnancy, In: **Reproduction in Cattle**. Oxford-UK: Blackwell Publishing, 3º ed, 2004.
- BARRETTO, L. S. S. **Avaliação dos efeitos da inibição da maturação nuclear e de antioxidantes sobre a maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário bovino *in vitro***. 2007, f. 113 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal – SP.
- BARUSELLI, P. S.; VIEIRA, L. M.; BATISTA, E. O. S.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; GIMENES, L. U.; TORRES-JUNIOR, J. R. S.; MARTINS, C. M.; SÁ FILHO, M. F.; BO, G. A. Produção *in vitro* de embrião bovino Atualização sobre estratégias de produção de embriões. **Anais...** Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Gramado-RS, p. 52-60. 2015.
- BERTAGNOLLI, A. C.; GONÇALVES, P. B. D.; GIOMETTI, I. C.; COSTA, L. F. S.; OLIVEIRA, J. F. C.; GONÇALVES, I. D. V.; BARRETO, K. P.; EMANUELLI, I. P.; BORGE, L. F. K. Interação entre células do *cumulus* e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 56, n.4, p.488-496, 2004.
- BUENO, P.; A. BELTRAN, M. P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Ver. Elet. Med. Vet.**, n.11, p.1-7, 2008
- CASTILHO, C.; ASSIS, G. S.; GARCIA, J. M. Influência do diâmetro e da fase folicular sobre a competência *in vitro* de oócitos obtidos de novilhas da raça Nelore. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, p.288-294, 2007
- CHAVES, R. N.; DUARTE, A. B. G.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J.R. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 34, p. 37-49, 2010.
- COELHO, L. A.; ESPER, C. R.; ALVAREZ, R. H.; VANTINI, R.; ALMEIDA JUNIOR, I. L. A.

- Produção *In vitro* de embriões bovinos: Utilização de diferentes fontes de gonadotrofinas na maturação dos oócitos. **Rev. Bras. Zootec.**, V.31, n.3, p. 1117-1121, 2002.
- CORRÊA, G. A. **Tensão de oxigênio durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos: efeito na produção e expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo.** 2006. 76f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade de Brasília, Brasília – DF.
- DE BEM, T. H. C.; ADONA, P. R.; BRESSAN, F. F.; MESQUITA, L. G.; CHIARATTI, M. R.; MEIRELLES, F. V.; LEAL, C. L. V. The influence of morphology, follicle size and Bcl-2 and Bax transcripts on the developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals.**, v.49, p.576-583, 2014
- DICKINSON, S. E.; GEARY, T. W.; MONNIG, J. M.; POHLER, K. G.; GREEN, J. A.; SMITH, M. F. Efeito da maturação do folículo pré-ovulatório no estabelecimento da prenhez em bovinos: o papel da competência oócitaria e do ambiente materno, **Anais...** Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, p.107-114. 2016.
- DIAS, L. P. B.; SA, W. F.; CAMARGO, L. S. A.; RAMOS, A. A.; FERREIRA, A. M.; VIANA, J. H. M.; NOGUEIRA, L. A. G. Concentração espermática e tempo de incubação na fecundação *in vitro* usando-se sêmen de touros da raça Guzerá. **Arq. Bras. Med. Vet.**, v.58, 2006.
- DODE, M. A. N.; RUMPF, R. In: Produção *in vitro* de embriões: eficiência, limitações e perspectivas Futuras - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 10f, 2002
- ECKERT, J.; NIEMANN, H. *In vitro* maturation, fertilization and culture to blastocysts o bovine oocytes in protein-free media. **Theriogenology**, n. 43, p. 1211-1225, 1995.
- FLAHERTY, C. O. Redox regulation of mammalian sperm capacitation. **Asian J Androl.**, V,17.p 583-590. 2015.
- FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos taurus indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 2010.
- FONSECA, J. F.; SOUZA, J. M. G.; CAMARGO, L. S. A. Produção de oócitos e embriões de pequenos ruminantes: passado, presente e futuro. **Anais...** Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, v. 24, p. 85-96. 2010.
- GEBREMEDHIN, D.; PANDEY, H O.; SALILEW-WONDIM, D.; HOELKER, M.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Dinâmica e papel dos microRNAs durante o desenvolvimento folicular em mamíferos. **Anais...** Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, 2016, v. 30, p. 140-147. 2016.
- GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** 2ª ed. São Paulo – SP: Varela, p.408, 2008.
- GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** São Paulo: Varela, p.195- 226. 2002
- GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H. B.; SANDRI, L. R. S.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Rev Bras Reprod Anim.**, v.31, p.212-217, 2007.
- GABALDI, S. H.; WOLF, A.; ESPER, C. R. Os eventos da fertilização em mamíferos. **Ciência, Agricultura e Saúde**, v. 2, p 61-65, n. 2, 2002.
- GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião, **Rev Bras Reprod Anim.**, Belo Horizonte, v.33, n.2, p.82-94, 2009.
- GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos.** 2ª ed. London: CABI Publishing, p.548, 2003.
- GUEMRA, S.; DA SILVA SANTO, E.; ZANIN, R.; MONZANI, P. S.; SOVERNIGO, T. C.; OHASHI, O. M.; VERDE LEAL, C. L.; ADONA, P. R. Effect of temporary meiosis block during prematuration of bovine *cumulis-oocyte complexes* on pregnancy rates in a comercial setting for *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v.81, p. 982-7, 2014.
- GUERREIRO, B. M.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F.; RODRIGUES, C. A.; CASTRO NETTO, A.; SILVEIRA, C. R. A.; BAYEUX, B. M.; DIAS, E. A. R.; MONTEIRO, F. M.;

- ACCORSI, M.; LOPES, R. N. V. R.; BARUSELLI, P. S. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. **Domest Anim Endocrinol.**, v. 49, p.96-104, 2014.
- HAFEZ, B e HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7ª ed. Barueri- SP : Manole, 2004.
- HENKEL, R. R.; SCHILL, W. B. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology.**, V.1, p. 1-22, 2003.
- IETS. **International embryo transfer society**. Statistics and data retrieval committee report. Embryo Transfer Newsletter. 2014.
- KASSENS, A.; HELD, A.; SALILEW-WONDIM, D.; SIEME, H.; WRENZYCKI, C.; TESFAYE, D.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M. Intrafollicular Oocyte Transfer (IOFT) of Abattoir-Derived and In Vitro-Matured Oocytes Results in Viable Blastocyst and Birth of Healthy Calves. **Biology of reproduction.**, V,92. P 1-14 2015.
- KADARMIDEEN, H. N.; MAZZONI, G.; WATANABE, Y. F.; STROBECH, L.; BARUSSELI, M. F. G. Seleção genômica de embriões produzidos *in vitro* e por transferência nuclear de células somáticas para a aceleração do melhoramento genético na produção bovina. **Anais...** Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Gramado-RS, v. 29, p. 67-75. 2015.
- LIMA, I. M. T.; SOUZA, A. L. Desenvolvimento e sobrevivência de embriões no período de pré-implantação: enfoque em ruminantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, V.33, p.194-202, 2009.
- LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F.; RIEGER, D.; HUMBLLOT, P.; BOLAND, M. P. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, Sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **Journal Reproduction and Fertility.**, v. 117, p. 159-167, 1999.
- LOIOLA, M. V. G.; CHALHOUB, M.; RODRIGUES, A. S.; FERRAZ, P. A.; BITTENCOURT, R. F.; FILHO, A. L. R. Validação de um programa de produção *in vitro* de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. **Cienc. Anim. Bras.**, Goiânia, v.15, n.1, p. 93-101. 2014.
- MACHADO, C. I. I. U. F.; GUIMARÃES, A. C. G.; GONÇALVES, C. G. M. Influência do sêmen de diferentes touros sobre as taxas de fecundação *in vitro* e desenvolvimento de embriões. **Anais ...** In: Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, Universidade Federal do Pampa, v. 4, 2012.
- MARTINEZ, I. N.; SOUZA, L. C. **Transferência de embrião e fertilização *in vitro* (FIV) em bovinos**. 2007. 88 f. Pós-Graduação (Especialização em Produção e Reprodução Bovina) – Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2007.
- MAZIERO, R.; GUAITOLINI, C.; PASCHOAL, D. M.; KIEVITSBOSCH, T.; GUASTALI, M. D.; MORAES, C. N.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Effect of Temporary Meiotic Attenuation of Oocytes with Butyrolactone I and Roscovitine in Resistance to Bovine Embryos on Vitrification. **Reprod Domest Anim.**, v.51, p.204-11, 2016.
- MELO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte- MG, v.40, n.2, p.58-64, 2016
- MENCHACA, A.; BARRERA, N.; DOS SANTOS NETO, P. C.; CUADRO, F.; CRISPO, M. Advances and limitations of *in vitro* embryo production in sheep and goats. **Anim. Reprod.**, V.13, p. 273-278, 2016.
- MIRANDA, M. S.; CARVALHO, C. M. F.; CORDEIRO, M. S.; SANTOS, S. S. D.; OHASHI, O. M. Sistemas alternativos de incubação e meios de cultivo para produção *in vitro* de embrião bovino. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 31, n.2, p. 218/223, Belo Horizonte, 2007.
- MOURA, A. A.; MEMILI, E. Aspectos funcionais do plasma seminal e proteínas espermáticas e seu potencial como marcadores moleculares da fertilidade. **Anais...** Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu. 2016, v. 30, p. 88-96, 2016.
- OIKAWA, T.; ITAHASHI, T.; NUMABE, T. Improved embryo development in Japanese black

cattle by *in vitro* fertilization using ovum pick-up plus intracytoplasmic sperm injection with dithiothreitol. **Reproduction and Development.**, v.62, p.11-16, 2016.

PALMA, G.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Anais...** In: Encontro sul americano de pecuária de leite, Pelotas, 2001.

PALMA, G. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos. In: **Biotecnología de la reproducción.** 2ª ed. Mar del Plata - Argentina, p 313-380, 2008.

PARRISH, J. J. Bovine *In vitro* fertilization: *In vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparina. **Theriogenology.**, v.81, p. 1-12, 2014.

PEREIRA, D. C.; DODE, M. A. N.; RUMPF, R. Evaluation of different culture systems on the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology.**, Stoneham, v. 63, n. 4, p. 1131-1141, 2005.

PONTES, J. H. F. **Aspectos Aplicados a produção *in vitro* de embriões *bos indicus*.** 2009, 156 f. Tese (doutorado) Programa de Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, Londrina - PR, 2009.

RAUBER, L. P.; ALVES, D. F.; FIGUEIRÓ, G. M.; BRUM, D. S.; HILGERT, T. F.; BERNARDI, M. L.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B. Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos mantidos em fluido folicular bovino de folículos de diferentes diâmetros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, n. 40, p. 169-177, 2003.

ROOVER, R.; FEUGANG, J M. N.; BOLS, P. E. J.; GENICOT, G.; HANZEN, C. H. Effects of Ovum Pick-up Frequency and FSH Stimulation: A Retrospective Study on Seven Years of Beef Cattle *In Vitro* Embryo Production. **Reprod Dom Anim.**, v.10, p. 1439-1531, 2007.

SENEDA, M. M.; Santos, G. M. G.; Silva, K. C. F.; Spegiorin, M. R.; Blaschi, W.; Pontes, J. H. F.; Situação atual da aspiração folicular e da fecundação *in vitro*. biotecnologia da reprodução em bovinos. **Anais...** In: 2º Simpósio internacional de reprodução animal aplicada, Londrina- PR, p. 172- 178. 2006.

SILVA, C.; CALEGARI, R. S.; MARTINS JR, A. Desenvolvimento de embriões bovinos após maturação *in vitro* de oócitos em meio de cultivo suplementado com taurina ou glicina. **Vet. e Zootec.**, v.16, p.89-100, 2009.

SILVA, C. M. G.; FAUTINO, L. R.; SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J. R. Influência da tensão de oxigênio na maturação oócitaria e cultivo *in vitro* de folículos e embriões. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte – MG, v.34, n.4m p.233-242, 2010

SILVA, J. B.; PANAINO, T. R.; TAMM, M. A.; LIRA, P.; ARÊAS, P. C. F.; MANCEBO, A. C. A.; SOUZA, M. M.; ANTUNES, R. A.; SOUZA, M. C. B. Prediction of metaphase II oocytes according to different serum Anti-Mullerian hormone (AMH) levels in antagonist ICSI cycles. **JBRA Assist. Reprod**, v.20, p. 222-226, 2016.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality, **Theriogenology**, v.65, p. 162-136, 2006.

STROEBECH, L.; MAZZONE, G.; PEDERSEN, H. S.; FREUDE, K. K.; KADARMIDEEN, H. N.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P. *In vitro* production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology. **Anais...** Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Gramado- RS, v. 29, p. 148-156. 2015.

SUTTON-MCDOWALL, M. L.; THOMPSON, J. G. Metabolismo do oócito e do embrião pré-implantação. **Anais...** IN: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Gramado-RS, v.29, p. 88-98. 2015.

TAKAHASHI, M.; KEICHO, K.; TAKAHASHI, H.; OGAWA, H.; SCHULTZ, R. M.; OKANO, A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in vitro cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenology**, Stoneham, v. 54, n. 1, p. 137-145, 2000.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW AM. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. **Theriogenology**, v. 65, p. 914-925, 2006.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 36, p. 100-109, 2008.

VEGA W. H. O.; QUIRINO, C. R.; SERAPIÃO, R. V.; OLIVEIRA C. S.; PACHECO, A. Phenotypic correlations between ovum pick-up *in vitro* production traits and pregnancy rates in Zebu cows. **Genetics and Molecular Research**, v.14, p. 7335-7343, 2015.

VERNUNFT, A.; SCHWERHOFF, M.; VIERGUTZ, T.; DIEDERICH, M.; KUWER, A. Anti-Muellerian hormone levels in plasma of Holstein-Friesian heifers as a predictive parameter for ovum pick-up and embryo production outcomes. **Journal of reproduction and development**, v.61, p.74-79, 2015.

VIANA J. H. M. e CAMARGO L. S. A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova Realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, Supl. 3, p. 915-924. 2007

VIANA, J. H. M.; BOLS, P. E. J. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos *cumulus-oócito* por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p. 1-4, 2005

VIEIRA, L. M.; RODRIGUES, C. A.; CASTRO NETO, A.; GUERREIRO, B. M.; SILVEIRA, C. R. A.; MOREIRA, R. J. C.; SÁ FILHO, M. F.; BÓ, G. A.; MAPLOTTOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve *in vitro* embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v.82, p.318-324, 2014.

XU, J.; GUO, Z.; SU, L.; NEDAMBALE, T. L.; ZHANG, J.; SCHENK, J.; MORENO, J. F.; DINNYES, A.; JI, W.; TIAN, X. C.; YANG, X.; DU, F. Developmental potential of vitrified holstein cattle embryos fertilized *in vitro* with sex-sorted sperm. **J Dairy Sci.**, v. 89, p.2510-2518, 2006.

WATANABE, Y. F.; WATANABE, M. R.; DAYAN, A.; VILA, R. A. The effect of bull on OPU-IVP in zebu cattle. Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, v. 27, n.1, p. 297, 1999.

WATSON, A. J.; DESOUSA, P.; CAVENEY, A.; BARCROFT, L. C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; WESTHUSIN, M. E. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcriptional levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 62, n. 2, p. 355-364, 2000.

WRENZYCKI, C. Sistemas de cultivo *in vitro*: quão longe estamos das condições ideais?. **Anais...** Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, v.30, p. 155-159. 2016.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS, A.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; NIEMANN, H. Effect of culture system and protein supplementation on mRNA expression. In pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction Update.**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 893-901, 2001.

1. Discente do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu Mestrado em Desenvolvimento Rural Sustentável. Universidade Estadual de Goiás, São Luís de Montes Belos, Goiás, Brasil. e-mail de contato: patriciafpeixer@gmail.com

2. Docente do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu Mestrado em Desenvolvimento Rural Sustentável. Universidade Estadual de Goiás, São Luís de Montes Belos, Goiás, Brasil. e-mail de contato: klaytosantos@gmail.com

3. Docente do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu Mestrado em Desenvolvimento Rural Sustentável. Universidade Estadual de Goiás, São Luís de Montes Belos, Goiás, Brasil. e-mail de contato: aracele.pales@ueg.br

4. Docente do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu Mestrado em Desenvolvimento Rural Sustentável. Universidade Estadual de Goiás, São Luís de Montes Belos, Goiás, Brasil. e-mail de contato: clarice.backes@ueg.br

5. Discente do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu Mestrado em Desenvolvimento Rural Sustentável. Universidade Estadual de Goiás, São Luís de Montes Belos, Goiás, Brasil. e-mail de contato: jaquelinefds12@gmail.com

6. Discente do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu Mestrado em Desenvolvimento Rural Sustentável. Universidade Estadual de Goiás, São Luís de Montes Belos, Goiás, Brasil. e-mail de contato: camilacometa@hotmail.com

