

CENTRO UNIVERSITÁRIO BRASILEIRO
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ANDRÉ FREITAS DE OLIVEIRA
MARIA BETÂNIA VELOSO DE FREITAS
NATHALIA BEZERRA BARBOZA

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS:
REVISÃO DE LITERATURA**

RECIFE/2023

ANDRÉ FREITAS DE OLIVEIRA
MARIA BETÂNIA VELOSO DE FREITAS
NATHALIA BEZERRA BARBOZA

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS:
REVISÃO DE LITERATURA**

Monografia apresentada ao Centro
Universitário Brasileiro – UNIBRA,
como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Medicina Veterinária.

Professor Orientador: Prof. Dr.
Rafael Artur da Silva Júnior.

RECIFE/2023

Ficha catalográfica elaborada pela
bibliotecária: Dayane Apolinário, CRB4- 2338/ O.

O48p

Oliveira, André Freitas de.

Produção *in vitro* de embriões bovinos: revisão de literatura/ André Freitas de Oliveira; Maria Betânia Veloso de Freitas; Nathalia Bezerra Barboza. - Recife: O Autor, 2023.

32 p.

Orientador(a): Dr. Rafael Artur da Silva Júnior.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Centro Universitário Brasileiro – UNIBRA. Bacharelado em Medicina Veterinária, 2023.

Inclui Referências.

1. Bovinocultura. 2. Fertilização. 3. Melhoramento genético. I. Freitas, Maria Betânia Veloso de. II. Barboza, Nathalia Bezerra. III. Centro Universitário Brasileiro. - UNIBRA. IV. Título.

CDU: 619

*Dedicamos este
trabalho a nossa
família.*

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Deus, pelo dom da vida, por ter nos dado saúde e força para chegar até aqui e não desistir, sem ele nós não seríamos nada.

A nossa família que sempre nos incentivou e deu total apoio, é por eles que chegamos até aqui.

Aos mestres que fizeram parte da nossa formação, a eles, somos gratos por todos os ensinamentos.

Ao nosso orientador professor Dr. Rafael Artur da Silva Júnior, pela grande contribuição no nosso desenvolvimento acadêmico, nos orientando para a construção desse trabalho.

À coordenação do curso, que sempre foi muito solícita.

Aos amigos que fizemos durante todo o curso, foi uma verdadeira família, um sempre ajudando e incentivando o outro nos momentos necessários.

Ao Centro Universitário Brasileiro - UNIBRA que abriu as portas para nós, e nos mostrou que podemos ser excelentes profissionais e que, durante o curso, nos fez enxergar que é só o começo para uma vida profissional brilhante.

Por fim, agradecemos a todos que nos ajudaram para a conclusão dessa etapa profissional.

"Toda vez que o arco-íris estiver nas nuvens, olharei para ele e me lembrarei da aliança eterna entre Deus e todos os seres vivos de todas as espécies que vivem na terra".

(Gênesis 9,16)

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS: REVISÃO DE LITERATURA

André Freitas de Oliveira¹
Maria Betânia Veloso de Freitas¹
Nathalia Bezerra Barboza¹
Rafael Artur da Silva Júnior²

Resumo: A evolução da bovinocultura no Brasil é crescente, colocando-a em evidência, tudo isso é reflexo de um planejamento estruturado ao longo do tempo, alavancando a produtividade e a qualidade do produto. Tendo o país o segundo maior rebanho do mundo ficando atrás apenas da Índia. Aliar a tecnologia à melhora do rebanho é algo indispensável para o produtor que deseja maximizar seus resultados. Nesse sentido algumas técnicas são essenciais como: Inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE), essa última é uma biotécnica que busca extrair o máximo potencial genético do rebanho, e é utilizada em larga escala comercial no mundo, sendo bastante vantajosa pois consegue produzir descendentes de animais que não estão no mesmo espaço físico. A PIVE é subdivida nas seguintes etapas: coleta, maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. O referido trabalho apresenta uma revisão de literatura sistemática a respeito da produção *in vitro* de embriões bovinos. Para tal, foram realizadas pesquisas nas bases de dados do IBGE, Pubmed, Pubvet, Scielo, Google acadêmico e no site da EMBRAPA, aplicando um intervalo de tempo de 5 anos. Apesar dos avanços, ainda são necessárias mais pesquisas sobre o tema para que se possa potencializar a técnica, maximizando a taxa de prenhez e reduzindo o custo dos insumos utilizados na produção de embriões *in vitro*, para que se torne cada vez mais acessível aos produtores.

Palavras-chave: bovinocultura; fertilização; melhoramento genético.

¹ Alunos do Curso Bacharel em Medicina Veterinária da UNIBRA

² Professor(a) da UNIBRA. Doutor em Medicina Veterinária. E-mail: rafael.artur@grupounibra.com.

IN VITRO PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS: LITERATURE REVIEW

Abstract: The evolution of cattle farming in Brazil is increasing, putting it in the spotlight, all of this is a reflection of structured planning over time, leveraging productivity and product quality. The country has the second largest herd in the world, second only to India. Combining technology with improving the herd is essential for producers who want to maximize their results. In this sense, some techniques are essential, such as: Fixed-time artificial insemination (IATF), embryo transfer (ET) and in vitro production of bovine embryos (PIVE), the latter is a biotechnique that seeks to extract the maximum genetic potential of the herd, and is used on a large commercial scale around the world, being quite advantageous as it can produce descendants of animals that are not in the same physical space. PIVE is subdivided into the following stages: collection, maturation, fertilization and in vitro cultivation. This work presents a systematic literature review regarding the in vitro production of bovine embryos. To this end, searches were carried out in the IBGE, Pubmed, Pubvet, Scielo, Google Scholar and EMBRAPA website databases, applying a time interval of 5 years. Despite advances, more research is still needed on the subject so that the technique can be enhanced, maximizing the pregnancy rate and reducing the cost of inputs used in the production of in vitro embryos, so that it becomes increasingly accessible to producers.

Keywords: cattle breeding; fertilization; genetical enhancement.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Número de embriões produzidos ou coletados de gado bovino no período 2002-2021, por continente. (A) Embriões produzidos *in vitro* (IVP); (B) Embriões derivados *in vivo* (IVD)..... 15
- Figura 2** - Coleta de oócitos *in vivo* guiada por ultrassonografia.....17
- Figura 3** - Coleta de oócitos *post mortem*.....17
- Figura 4** - Representação esquemática da configuração da aspiração folicular guiada por ultrassom transvaginal (OPU) em vaca viva..... 19
- Figura 5** - Classificação dos oócitos de acordo com o complexo *cumulus*-oócitos.....20
- Figura 6** - Etapas da maturação nuclear..... 22
- Figura 7** - Diagrama esquemático que resume os principais fatores que causam estresse oxidativo em oócitos de mamíferos durante sua maturação *in vitro*..... 23
- Figura 8** - Representação esquemática do gradiente de Percoll®..... 26
- Figura 9** - Classificação morfológica de embriões conforme o Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões..... 27
- Figura 10** - Fotografias de embriões bovinos em vários estágios de desenvolvimento. Blastocisto inicial (Bi), blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX) e blastocisto eclodido (BE), respectivamente..... 30
- Figura 11** - Protocolo de sincronização das receptoras.....31
- Figura 12** - Representação esquemática de um embrião durante os métodos de congelamento lento e vitrificação. Os hexágonos brancos representam os cristais de gelo. A concentração de crioprotetores é a parte escura do sombreado.....33
- Figura 13** - Fluxo do processo de coleta de óvulos (OPU) de *Bos indicus* e *Bos taurus*, maturação *in vitro* (MIV) de oócitos, fertilização *in vitro* (FIV), cultura *in vitro* (CIV) de embriões, coleta de biópsias, seleção genômica usando marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) e criopreservação..... 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação morfológica dos complexos <i>cumulus</i> oócitos bovinos.....	19
Tabela 2 - Qualidade dos complexos <i>cumulus</i> oócitos oriundos de ovários de vacas de abatedouros nas estações de verão e inverno na Região do Recôncavo da Bahia.....	21
Tabela 3 - Classificação de qualidade dos embriões de acordo com o Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões.....	29
Tabela 4 - Taxa de gestação de embriões bovinos, de raças de corte e leite, produzidos in vitro, de acordo com o estágio de desenvolvimento do embrião.....	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 METODOLOGIA	13
3 DESENVOLVIMENTO	13
3.1 Biotecnologias da reprodução animal.....	13
3.2 Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	15
3.2.1 Obtenção e classificação de oócitos.....	16
3.2.2 Maturação <i>in vitro</i>	21
3.2.3 Fertilização <i>in vitro</i>	24
3.2.3.1 Capacitação espermática.....	25
3.2.4 Cultivo <i>in vitro</i>	26
3.3 Transferência de embrião.....	30
3.4 Criopreservação de embriões.....	32
3.5 Características de embriões produzidos <i>in vitro</i>	34
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a pecuária de leite e de corte vem apresentando vasto crescimento nos últimos anos, sendo responsável por gerar empregos de forma direta e indireta contribuindo com o crescimento da economia do país (Malafaia *et al.*, 2019). No ano de 2022, o Brasil exportou 2,26 milhões de toneladas de carne, um aumento de 22,6% em relação ao ano anterior, arrecadando mais de US\$ 3,7 bilhões (ABIEC, 2023). Já em relação ao leite, em 2021 a produção nacional foi de 35,3 bilhões de litros, desse total, 34% se refere ao leite produzido na região Sudeste (IBGE, 2022).

Nesse contexto, é fundamental destacar a importância do melhoramento animal, a base para que se possa aumentar a produtividade e elevar os lucros. Para isso, diversas biotécnicas podem ser utilizadas atualmente para que se obtenha uma melhora genética, e estão divididas em quatro gerações, a primeira com a inseminação artificial (IA) e a criopreservação, a segunda com a transferência de embriões (TE) e a superovulação, a terceira com a produção *in vitro* de embriões (PIVE) e sexagem, e por fim, a quarta com a clonagem e transgenia (Souza, 2020; Ovídio, 2022).

Entre essas técnicas, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) vem se destacando e foi introduzida no Brasil em 1980, onde temos os primeiros registros, e desde então o país assumiu uma posição de destaque na adoção da PIVE em bovinos, tornando-se uma referência mundial (Viana *et al.*, 2018). A técnica baseia-se na interação dos gametas masculino e feminino, sendo dividida em etapas como a maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), e cultivo *in vitro* (CIV), e após essas etapas os embriões podem ser criopreservados ou transferidos para as receptoras previamente sincronizadas (Luedke *et al.*, 2019).

Essa biotecnologia tem um papel importante na pecuária, pois através dela é viável alcançar o melhoramento animal, visto que é possível selecionar animais com grande potencial genético e conseguir uma maior quantidade de embriões provenientes destes animais. Também é um efeito dessa técnica a melhora dos índices reprodutivos, fato que está diretamente ligado ao aumento

da produção e impacta de forma positiva nos lucros obtidos na bovinocultura (Carvalho; Carmo; Pinto, 2023).

Diante do exposto o objetivo do trabalho foi apresentar uma revisão sistemática a respeito da produção *in vitro* de embriões bovinos, com suas vantagens, desafios e importância para a bovinocultura.

2 METODOLOGIA

O desenvolvimento dessa pesquisa foi realizado através das bases de dados do IBGE, Pubmed, Pubvet, Scielo, Google acadêmico e no site da EMBRAPA, aplicando um intervalo de tempo de 5 anos para a maioria dos artigos, também foram utilizados artigos com um maior intervalo de tempo, devido a relevância das informações contidas e pelo fato de não terem sofrido alterações desde sua publicação. Foram utilizados artigos científicos, livros, e realizadas pesquisas a site de empresas que trabalham com o tema em questão, utilizando os seguintes descritores, maturação *in vitro*, fertilização, cultivo *in vitro*, oócitos, capacitação espermática.

A pesquisa foi inicialmente realizada com um estudo sobre o crescimento da bovinocultura, quais fatores estão sendo determinantes para isso. Diante disso foram realizadas inserções na revisão a cerca do tema proposto, onde foram pesquisados termos como oócitos, produção *in vitro*, reprodução, criopreservação, embriões entre outros. Foram pesquisados cerca de 97 trabalhos, nos idiomas inglês e português, sendo utilizados 73 destes para a construção dessa revisão de literatura, os critérios utilizados para inserção de trabalhos foram principalmente as biotecnologias utilizadas na PIVE.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 Biotecnologias da reprodução animal

Os primeiros registros na literatura acerca da possibilidade de manipular e maturar gametas, especialmente oócitos, em laboratório data da década de 1930, quando Pincus e Enzmann (1937) analisaram diversos estágios de

maturação e migração de oócitos em cortes histológicos de ovários de coelha. Nas décadas seguintes, o uso de outros modelos animais, como camundongo e hamster, permitiu publicação de dados mais robustos que foram a base para o avanço da pesquisa na área (Yanagimachi; Chang, 1963; Passos, 2004).

As descobertas realizadas com a manipulação de gametas e embriões *in vitro* em distintas espécies permitiram a criação e desenvolvimento de várias tecnologias de reprodução assistida (TRAs). Nos anos seguintes, tais tecnologias puderam ser voltadas para áreas como a pesquisa sobre problemas de infertilidade de casais, e melhoramento genético de animais de produção, como bovinos, ovinos e suínos, além da criação de bancos genéticos e preservação de gametas e embriões de espécies ameaçadas de extinção (Comizzoli; Paulson; McGinnis, 2018; Sjunnesson, 2020).

Em bovinos, a utilização das TRAs teve início na década de 1960 a partir do estudo da maturação *in vitro* de gametas femininos e, a partir do final da década de 1980, nasceram os primeiros bezerros vivos e saudáveis cujos oócitos foram maturados e fertilizados *in vitro* e os embriões cultivados *in vitro* até o estágio de blastocistos (Edwards, 1965; Sjunnesson, 2020).

Atualmente a pecuária dispõe de uma gama de biotecnologias reprodutivas que permitem maior desempenho comparado à reprodução natural, melhorando a eficiência reprodutiva e o ganho genético, tanto nos rebanhos de corte quanto de leite (Baruselli *et al.*, 2019a).

Dentre as biotecnologias, a IA e a TE são as mais aplicadas no mundo, sendo muitas vezes associadas a protocolos de sincronização da ovulação, ferramenta que possibilita a execução destas técnicas em um tempo pré-estabelecido e sem a necessidade de observação de estro, denominado de tempo fixo. A IA também permite o uso do sêmen congelado e descongelado, enquanto na TE as receptoras são sincronizadas para receber embriões produzidos *in vivo*, por superovulação seguida de coleta dos embriões por lavagem uterina, ou mesmo produzidos *in vitro* (Baruselli *et al.*, 2018a).

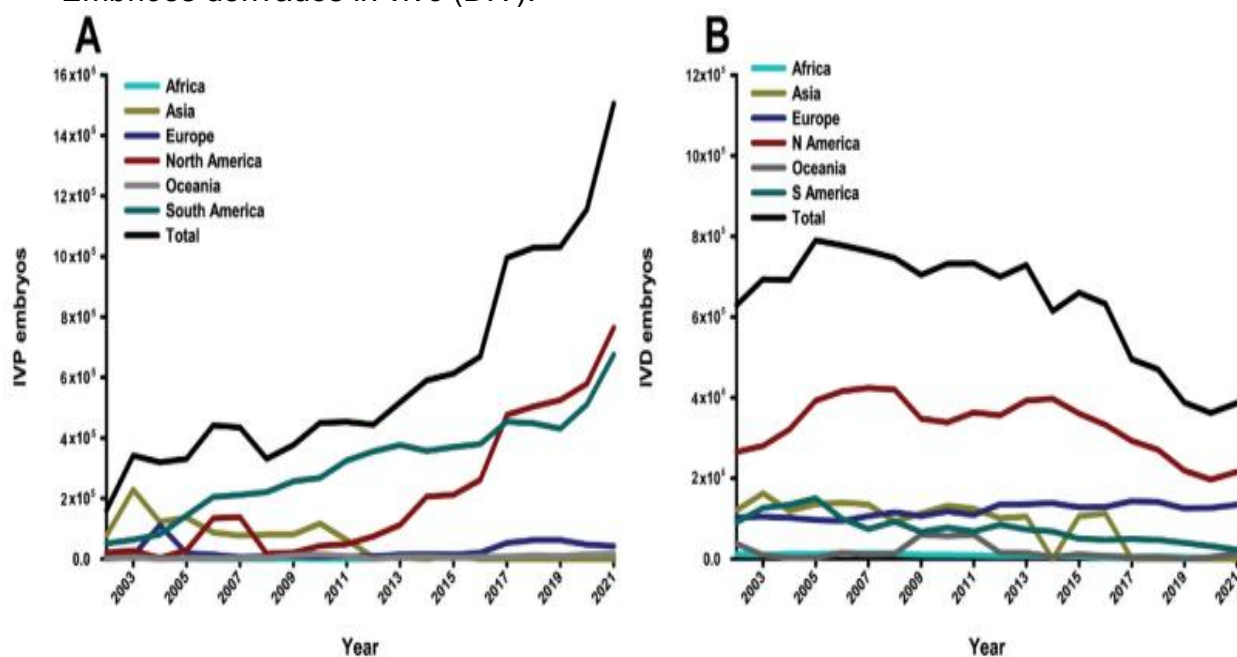
Com o crescente aumento do uso de biotecnologias da reprodução na pecuária brasileira, destaca-se também a técnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE) em bovinos, que visa maximizar os índices produtivos e os resultados, sendo o Brasil um destaque na produção de embriões *in vitro* no mundo (Viana, 2022).

3.2. Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A PIVE consiste na interação entre o espermatozoide e o oócito fora do trato reprodutivo da fêmea, sob condições laboratoriais, resultando na formação de um novo indivíduo. Possui por objetivo gerar embriões viáveis oriundos de animais saudáveis de alto valor genético, ou ainda a obtenção de descendentes de fêmeas não aptas a se reproduzirem por técnicas convencionais (Ealy; Wooldridge; Mccoski, 2019; Grázia; Santos, 2021).

Viana (2022) analisou o número de embriões produzidos *in vitro* e derivados *in vivo* de bovinos ao longo do tempo (Figura 1) e observou a tendência que favorece a PIVE na América do Norte e do Sul, regiões responsáveis pela maior parte dos embriões produzidos no mundo, sendo semelhantes (+32,1% e +35,3%, respectivamente) e contrastam com a Europa, onde os números diminuíram (-10,7%).

Figura 1 - Número de embriões produzidos ou coletados de gado bovino no período 2002-2021, por continente. (A) Embriões produzidos *in vitro* (PIV); (B) Embriões derivados *in vivo* (DIV).



Fonte: Viana (2022).

A utilização comercial da PIVE, no final da década de 1990, era principalmente para produção de embriões a partir de fêmeas com disfunções

reprodutivas. Com o passar do tempo houve um crescimento e difusão da técnica em vários países (Ferré *et al.*, 2020).

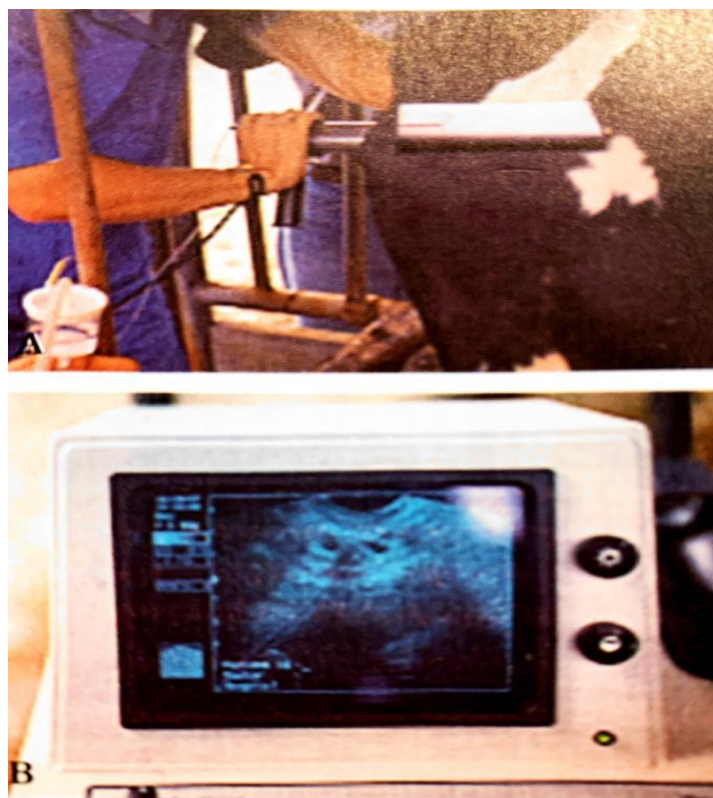
A PIVE abrange três etapas: a MIV dos oócitos após aspiração de ovários *in vivo* (conhecido por *ovum pick-up* ou OPU) ou coletados em frigorífico; a fertilização *in vitro* (FIV) dos oócitos pós-maturação; e o cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões até, normalmente, o estágio de blastocisto, período conhecido como desenvolvimento pré-implantacional (Ferré *et al.*, 2020). Com o aperfeiçoamento da técnica, aproximadamente 90% dos oócitos são maturados corretamente, com até 80% de sucesso nas taxas de FIV e a produção embrionária ao final do CIV pode atingir até 50% em alguns casos, tendo em média 30 a 40% (Ferré *et al.*, 2020; Sjunnesson, 2020), porém, menor que dos embriões gerados *in vivo* (Ealy; Wooldridge; Mccoski, 2019).

A variabilidade no sucesso das transferências de embriões *in vitro* é um dos grandes impasses para a sua expansão, uma vez que, para que se obtenha taxas de gestação satisfatórias através da PIVE, alguns fatores precisam ser verificados, considerando suas influências no resultado da técnica (Jelonschek *et al.*, 2018). Dentre eles destacam-se a qualidade do corpo lúteo, a sincronia das doadoras e receptoras, raça da doadora, a qualidade do embrião, o efeito do reprodutor, a qualidade e a viabilidade do sêmen, o estresse térmico, o período do ano e o número de transferências de embriões prévias para as receptoras, assim como a condição corporal e nutricional das mesmas (Becher *et al.*, 2018; Souza-Cácares *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020).

3.2.1 Obtenção e classificação de oócitos

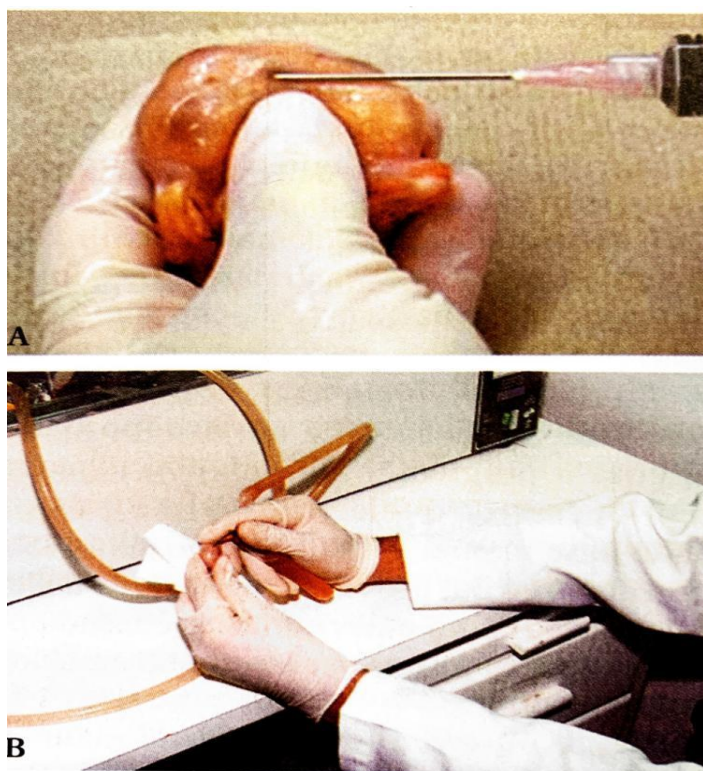
Em bovinos, os oócitos para produção *in vitro* de embriões podem ser obtidos de vacas e novilhas por meio das técnicas: aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU) de animais vivos (Figura 2) e aspiração folicular *post mortem* (derivada de ovários em abatedouro) (Figura 3). Nos dois procedimentos, os oócitos são aspirados de um grupo heterogêneo de folículos antrais, de 3 a 8 mm de tamanho, dominantes e subordinados de distintas ondas foliculares, tanto ovulatórias como não ovulatórias (Gallegos *et al.*, 2022).

Figura 2 – Coleta de óocitos *in vivo* guiada por ultrassonografia.



Fonte: Gonçalves *et al.*, 2016.

Figura 3 – Coleta de óocitos *post mortem*.



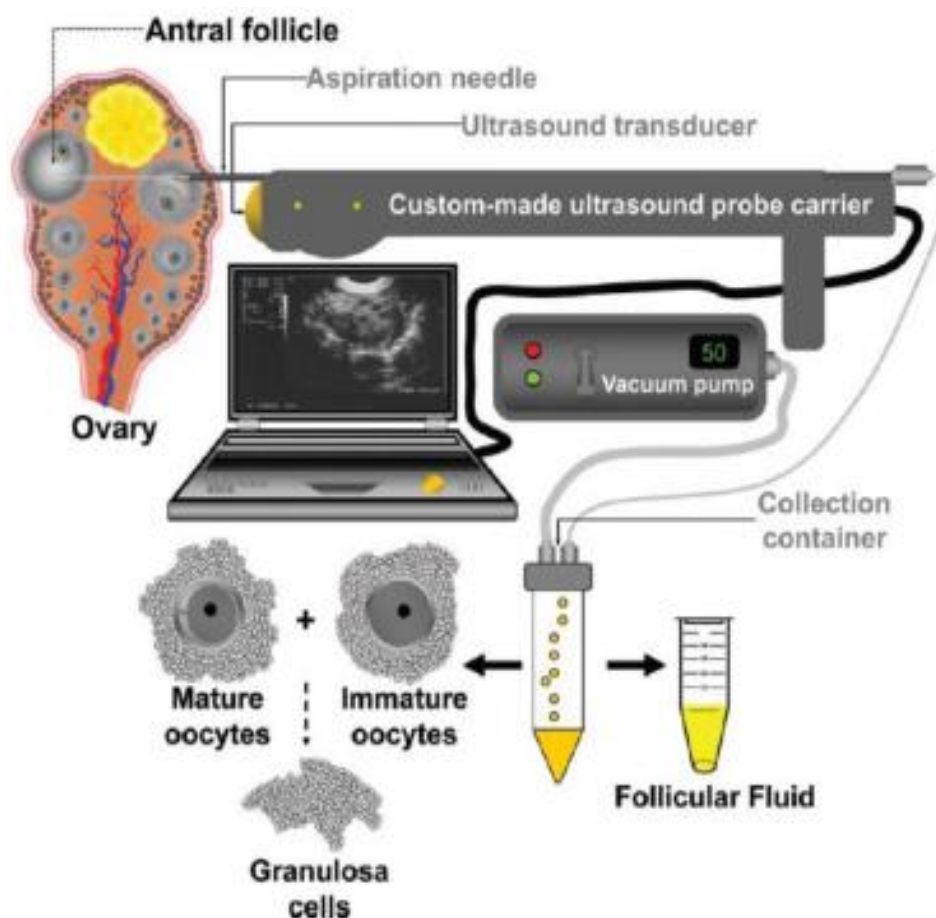
Fonte: Gonçalves *et al.*, 2016.

O processamento de ovários obtidos em abatedouro como fonte de recuperação de oócitos (células germinativas) tem sido amplamente utilizado como ferramenta e faz parte das rotinas em laboratório de PIVE comerciais e nos centros de pesquisa (Gallegos *et al.*, 2022). A aspiração folicular via OPU é considerada a melhor para o resgate de oócitos em animais vivos (Stroud; Callesen, 2018).

Na espécie bovina, além das vacas cíclicas, é possível obter oócitos viáveis por essa técnica em novilhas a partir de seis meses de idade, em vacas gestantes até o terceiro mês de gestação e entre duas a três semanas após parto (Silva *et al.*, 2021). Essa técnica possui a vantagem de poder ser feita em qualquer fase do ciclo estral e não interferir no estado fisiológico do animal, evitando gastos com tratamentos hormonais e reduzindo o número de manejos das doadoras (Silva *et al.*, 2021; Viana, 2022).

Para iniciar a aspiração, deve ser utilizado um *scanner* com sonda setorial endovaginal adequada (ou adaptada para uso vaginal) com agulha guiada, a qual é conectada a um tubo de ensaio e a uma bomba de vácuo para aspirar o líquido folicular e o oócito nele contido. Um scanner com boa resolução e com sonda de pelo menos 6 MHz é usado para visualizar folículos de até 2-3 mm de tamanho e também para observar a agulha durante o procedimento (Figura 4) (Ali, 2021).

Figura 4 - Representação esquemática da configuração da aspiração folicular guiada por ultrassom transvaginal (OPU) em vaca viva.



Fonte: Ali, 2021.

Várias classificações morfológicas têm sido adotadas para selecionar oócitos bovinos, na tentativa de identificar àqueles com maior potencial. Conforme Leibfried e First (1979), os oócitos podem ser classificados em escala de 1 a 4, levando em consideração as características do *cumulus* e do citoplasma do oócito (ooplasma) (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação morfológica dos complexos *cumulus* oócitos bovinos.

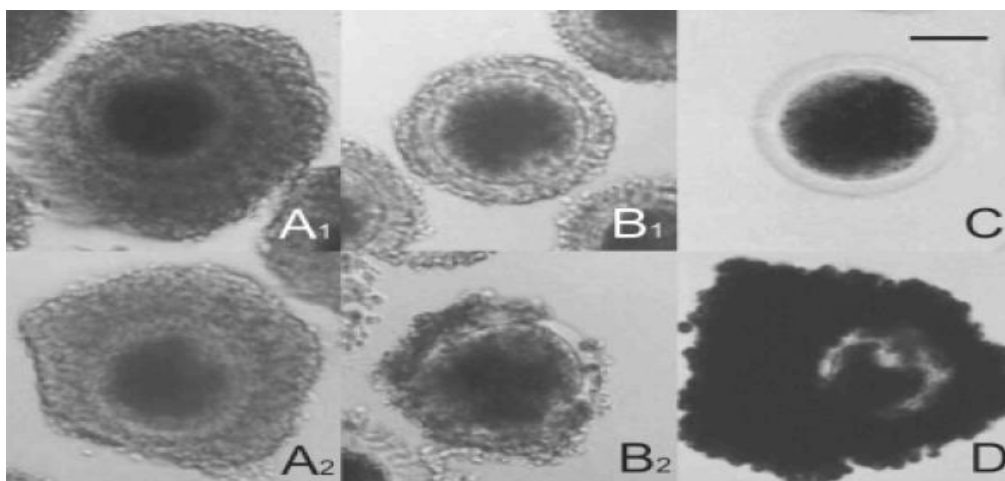
Oócitos	Descrição
Grau 1	<i>Cumulus</i> compacto presente, com mais de três camadas de células, ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom.

Grau 2	<i>Cumulus</i> compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas de células, ooplasma com granulações distribuídas de modo heterogêneo, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas num único local aparentando mancha escura, preenchendo o espaço do interior da zona pelúcida.
Grau 3	Espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino, degenerado, vacuolizado ou fragmentado.
Grau 4	Oócito desnudo ou sem <i>cumulus</i> .

Fonte: Modificado de Leibfried e First, 1979.

Apenas os oócitos que são rodeados por menos de uma ou mais capas de células do *cumulus* e que apresentam um citoplasma homogêneo são selecionados para o processo da maturação *in vitro* (Figura 5) (Gallegos *et al.*, 2022). Estas células do *cumulus* possuem uma associação com oócito por meio das junções GAP comunicantes, e são fundamentais para que o oócito adquira competência para suportar a fertilização e o desenvolvimento embrionário (Luedke *et al.*, 2019).

Figura 5 - Classificação dos oócitos de acordo com o complexo *cumulus*-oócitos.



Fonte: Alvarez *et al.*, 2009.

O número de complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) recuperados em cada sessão de OPU pode ser variável entre animais, e alguns fatores como o genótipo da doadora, nutrição, idade, sanidade, categoria, dentre outros podem influenciar a taxa de recuperação de oócitos bem como a transformação em embrião, a condição reprodutiva (gestante ou não), e a categoria das doadoras (nulíparas, primíparas ou pluríparas), podem também influenciar esta característica (Baruselli *et al.*, 2018b).

Carneiro *et al.* (2019) realizaram análise da qualidade dos COCs provenientes de ovários de vacas de abatedouros e constataram que o período do ano promoveu efeito sobre a qualidade oocitária ($P < 0,05$). Foi verificado maior quantidade de oócitos grau I e grau II no período do inverno, enquanto oócitos classificados como grau III e desnudos tiveram maior incidência no verão. Oócitos classificados como atrésico foram observados nos dois períodos, porém não houve diferença estatística entre inverno e verão ($P = 0,22$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Qualidade dos complexos *cumulus* oócitos oriundos de ovários de vacas de abatedouros nas estações de verão e inverno na Região do Recôncavo da Bahia.

Estação do ano	Grau I	Grau II	Grau III	Desnudo	Atrésico
Inverno	539 a	404 a	681 a	540 a	62
Verão	36 b	273 b	1879 b	849 b	41
P valor	0,00	0,04	0,00	0,04	0,22

Fonte: Carneiro *et al.* (2019).

Após a coleta os oócitos selecionados são mantidos em estufa de atmosfera controlada com temperatura de 38,5 °C, atmosfera com 5% de CO₂ e umidade de 95%, iniciando assim a fase de maturação *in vitro* (Petry *et al.*, 2019; Barrozo; Nascimento; Dias, 2022).

3.2.1 Maturação *in vitro*

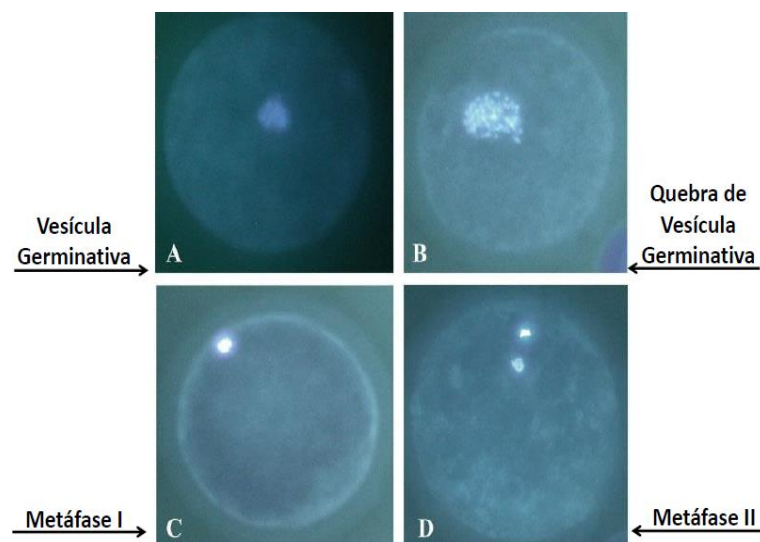
A Maturação *in vitro* (MIV) de oócitos derivados dos folículos antrais tem sido desenvolvida com sucesso (Luciano; Sirard, 2018), e esta etapa da geração embrionária envolve a expansão do COC, além de mudanças

nucleares, citoplasmáticas e moleculares que tornam o gameta apto à fecundação (Lonergan; Fair, 2016).

A maturação nuclear (Figura 6) ocorre sem influência das células do cumulus e é caracterizada pela ruptura da vesícula germinativa, que compreende os processos de condensação da cromatina e dissolução da membrana nuclear (Anguita *et al.*, 2007).

Concomitantemente à maturação nuclear, o citoplasma também sofre alterações na modulação da síntese de proteínas e reorganização de organelas citoplasmáticas, como redução do tamanho do Complexo de Golgi, aumento gradativo de lipídeos, compactação do nucléolo e alinhamento dos grânulos corticais próximos à membrana do oócito. Estes últimos possuem grande importância na prevenção da polispermia (Ferreira *et al.*, 2009).

Figura 6 - Etapas da maturação nuclear.



Fonte: Turathum *et al.*, 2010.

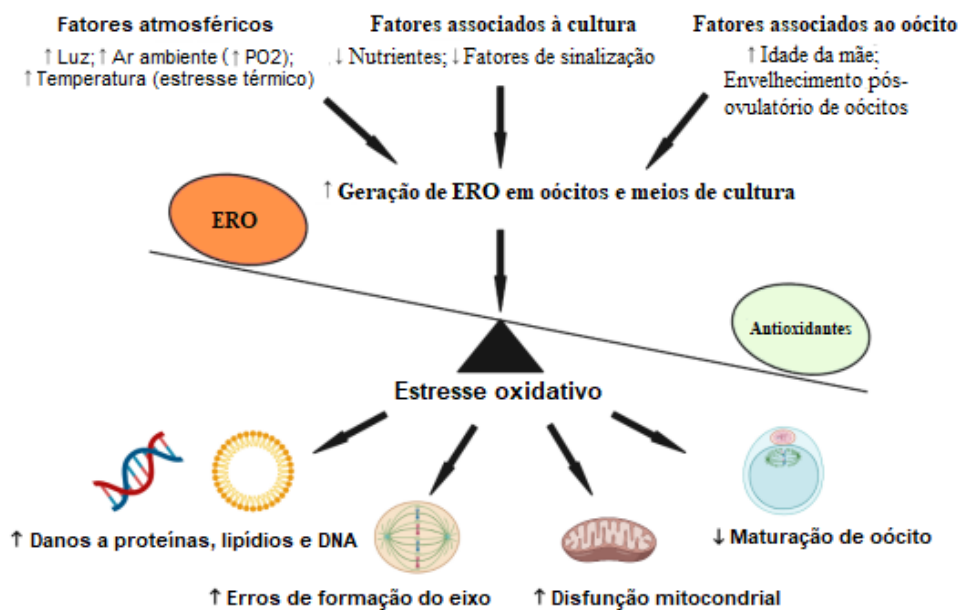
Durante a fase da maturação, para que se possa alcançar plena competência de desenvolvimento, os oócitos em crescimento *in vitro* podem exigir um período adicional de crescimento dentro do complexo do *cumulus* antes da maturação (McLaughlin *et al.*, 2018). Nesta fase é importante evitar a retomada espontânea da meiose, e isso pode ser alcançado pela modulação dos níveis de AMPc (adenosina monofosfato c(clico) pelo uso do inibidor da fosfodiesterase (PDE), enzima que degrada AMPc (Abdel-Ghani *et al.*, 2018). Foi desenvolvido um sistema simulado de maturação fisiológica de ovócitos

que consiste em cultura pré MIV com 500 mM IBMX antes da MIV, e verificado aperfeiçoamento da competência de desenvolvimento (Hashimoto *et al.*, 2019).

Durante a PIVE, as células são expostas à fatores oxidativos e os próprios meios de cultivo acabam por favorecer a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Soto-Heras; Paramio, 2020). Os níveis aumentados de ERO afetam a função mitocondrial e sua capacidade em gerar ATP (Adhikari *et al.*, 2022). Assim, a disfunção mitocondrial afeta o sucesso da maturação ovocitária, a sua fecundação *in vitro* e a embriogênese (Kirillova *et al.*, 2021).

Entre os vários fatores laboratoriais que contribuem para o acúmulo de ROS nos oócitos em maturação e nos meios da MIV estão aumento da intensidade da luz, altas temperaturas ambientes e aumento da pressão parcial de oxigênio (PO₂). Outros fatores incluem senescência materna, envelhecimento oocitário causado por atrasos na fertilização e nutrientes inadequados fornecidos pelos meios da MIV (Figura 7). Este último fator é inevitável, pois vários componentes do meio *in vivo* não podem ser simulados sob condições laboratoriais padrão, por exemplo, circulação sanguínea e moléculas de sinalização (Rakha *et al.*, 2022).

Figura 7 - Diagrama esquemático que resume os principais fatores que causam estresse oxidativo em oócitos de mamíferos durante sua maturação *in vitro*.



Fonte: Biorender, 2023.

Speckhart, Wooldridge e Ealy (2023) destacam, portanto, a importância do controle de temperatura durante todo o processo, bem como o preparo dos meios, para que todo o processo seja feito em tempo adequado para manter a qualidade dos oócitos. O uso da melatonina é uma alternativa para minimizar o estresse oxidativo na PIVE, devido suas propriedades antioxidantes (Ivanov *et al.*, 2021; Jiang *et al.*, 2021). Efeitos protetivos da melatonina em ovócitos bovinos e a melhora no desenvolvimento embrionário foram constatados em trabalhos tanto com ovócitos de vacas adultas, como com ovócitos de doadoras pré-púberes (Gutiérrez-Añez *et al.*, 2021; Pang *et al.*, 2018).

Todos esses eventos moleculares e bioquímicos que ocorrem no oócito até atingir a maturação devem ser estritamente controlados para que um gameta feminino viável esteja disponível para fertilização e desenvolvimento embrionário subsequente (Wrenzycki; Stinshoff, 2013). O sucesso na MIV é fundamental para capacitar o oócito para a fecundação e ocorre de 22 a 24 horas após a aspiração (Barrozo *et al.*, 2022).

3.2.2 Fertilização *in vitro*

A FIV ocorre quando há incubação de oócitos maduros com espermatozoides capacitados, em meio a fecundação, advindo a combinação do material genético dos gametas e posterior formação de zigoto que ocorre com o emparelhamento dos pró núcleos femininos e masculinos (Guarda, 2023).

Os espermatozoides devem ser adicionados às gotas de fecundação contendo os oócitos numa concentração que pode variar de 1×10^6 a 2×10^6 espermatozoides/mL no meio de fecundação que deve ter sido previamente preparado em ambiente nas mesmas condições de temperatura, atmosfera e umidade adotadas para a maturação *in vitro* (Gonçalves *et al.*, 2016).

Quando existe o contato do oócito na presença de cálcio extracelular com o espermatozoide, esse se liga aos receptores que estão na zona pelúcida passando assim por reação acrossômica, determinada pela fusão das membranas plasmática e acrossomal (Luedke *et al.*, 2019).

A FIV está condicionada ao uso de meios contendo substâncias capazes de mimetizar a capacitação espermática que acontece *in vivo*, quando

os espermatozoides entram em contato com o microambiente uterino e do oviduto, que disparam uma série complexa de eventos bioquímicos, que culminam com modificações celulares e moleculares (Rahman; Kwon; Pang, 2017).

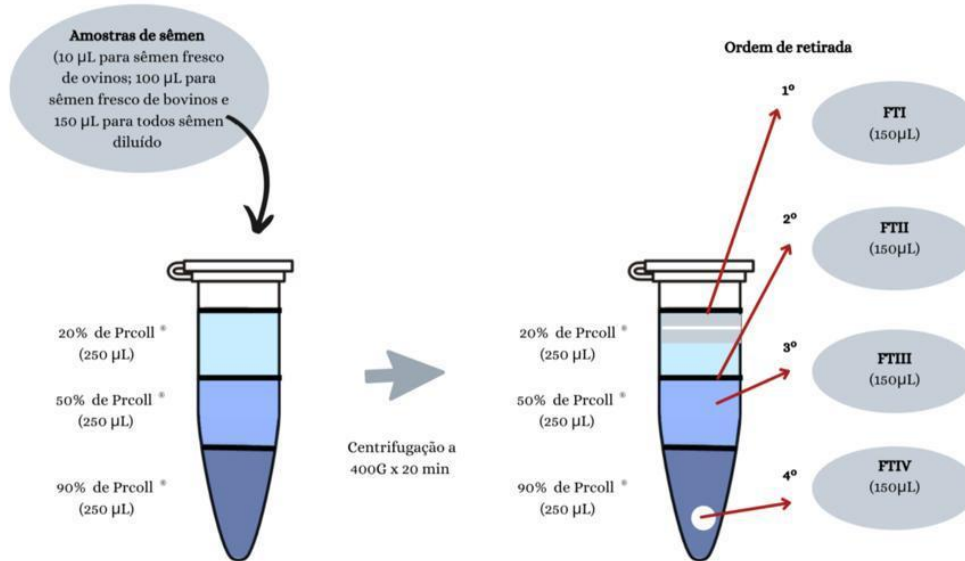
É fundamental que todo o processo seja feito concomitante a manipulação dos oócitos, e que seja seguido o protocolo para que a manipulação dos gametas seja realizada no tempo correto, sem que haja variação de temperatura e exposição desnecessária ao ambiente, o que pode afetar negativamente os resultados (Speckhart; Wooldridge; Ealy, 2023).

3.2.2.1 Capacitação espermática (gradiente de densidade, *swim-up*)

É importante mencionar que as características da amostra de sêmen utilizada influenciam de maneira significativa o desenvolvimento embrionário, mesmo após a fecundação (Siqueira *et al.*, 2018). As tecnologias de separação de espermatozoides na manipulação podem ser conduzidas através da centrifugação em gradiente de densidade Percoll ou do método *swim-up* (Xie *et al.*, 2020).

Para a técnica do gradiente de Percoll® (Figura 8) um mililitro de sêmen fresco pode ser colocado sobre a última camada de Percoll de três e cinco gradientes de concentrações e então centrifugado a 623 × g por dez min à temperatura ambiente (26°C). Dois terços da camada superior deve ser removido e o restante, resuspenso com 3 mL de solução salina balanceada de Earle (EBSS), centrifugado por 5 min a 492 × g para lavagem dos espermatozoides, seguido pelo descarte de 2 mL do sobrenadante. Os pellets restantes de 1 mL devem ser ressuspensos, lavados e ressuspensos novamente com 3 mL de EBSS e deixado em repouso por 10 min. Por fim, 1 mL da camada superior do sobrenadante será coletado para avaliar a qualidade dos espermatozoides e para posterior processamento (Meitei *et al.*, 2021).

Figura 8 - Representação esquemática do gradiente de Percoll®.



Fonte: Feijó, 2022.

Swim-up é um método de seleção de espermatozoides que consiste na adição de uma amostra seminal no fundo de um tubo contendo meio de cultura, permitindo que somente os espermatozoides móveis subam, sendo assim coletada na fração superior no topo do tubo (Navarro-Serna *et al.*, 2021), portanto, a técnica *swim-up* seleciona os espermatozoides mais ativos e móveis (Meitei *et al.*, 2021). Para avaliação, pode ser utilizado 3 mL de EBSS cuidadosamente posta em tubo de centrifugação contendo 1 mL de sêmen fresco para o processo de *swim-up*. O tubo deve ser inclinado em 45° e incubado por 1 h a 27°C até 28,5°C. O tubo deve ser cuidadosamente invertido para a posição vertical, então 1 mL da camada superior (sobrenadante) é colhida para avaliação da qualidade das células espermáticas e posterior processamento (Meitei *et al.*, 2021).

3.2.3 Cultivo *in vitro*

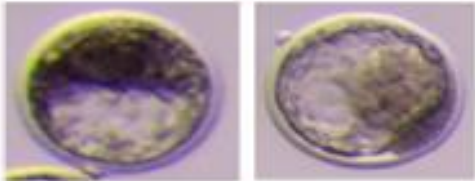
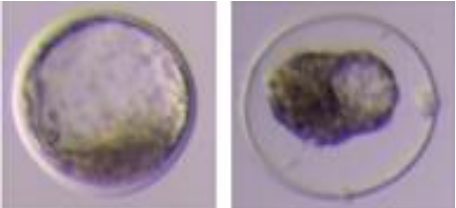
Após a fecundação, que pode variar de 12 a 24 horas, é efetuado o desnudamento, que é a remoção das células do *cumulus* sem afetar a zona pelúcida, através da pipetagem com força e velocidade contínua (Speckhart; Wooldridge; Ealy, 2023). Posteriormente, os zigotos são colocados em uma

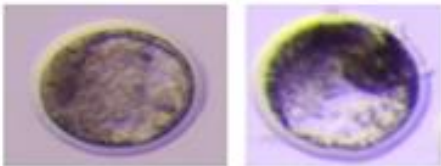
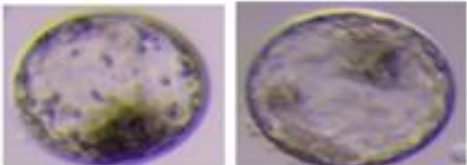
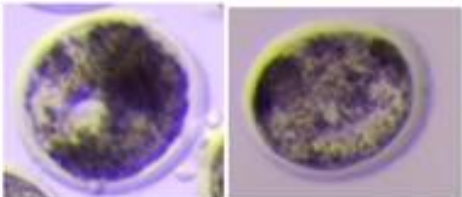
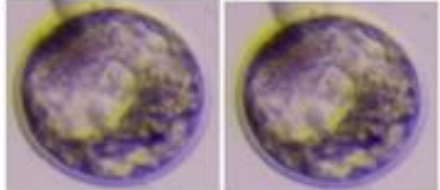
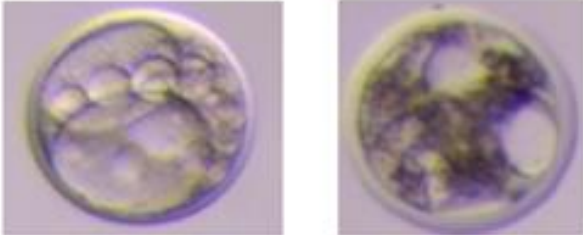
placa com meio específico que irá proporcionar o seu desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Este processo é chamado de CIV, quando há a ativação do genoma embrionário, clivagem e diferenciação (Barrozo *et al.*, 2022).

O desenvolvimento embrionário é avaliado no 6º dia, sendo analisada a taxa de produção de blastocistos em relação ao número de oócitos selecionados, a compactação dos blastômeros e formação inicial da blastocele, e no 7º dia é realizada a classificação morfológica para seleção dos embriões aptos a serem transferidos ou criopreservados (Barrozo *et al.*, 2022).

A Sociedade Internacional de Transferência de Embrião elaborou um manual que classifica os estágios e qualidade de desenvolvimento do embrião (Figura 9). A classificação por estágio leva em consideração atributos relacionados à evolução do desenvolvimento embrionário, como grau de compactação, tamanho e número das células embrionárias (blastômeros), formação da cavidade embrionária (blastocele) e envoltório externo (embrião e zona pelúcida). Após a fertilização, esperam-se que a cada dia o embrião esteja em um determinado estágio de desenvolvimento (Barfield; Demetrio, 2022).

Figura 9 - Classificação morfológica de embriões conforme o Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões.

Códigos de qualidade do embrião	Blastocistos	Blastocistos Expandidos
Código I – Excelente ou bom		

Código II – Razoável		
Código III – Ruim		
		
Código IV – Degenerado		

Fonte: Barfield e Demetrio, 2022.

Já a classificação de qualidade leva em consideração alguns fatores para classificar os embriões tais como: imperfeições como presença de blastômeros de tamanhos irregulares, apresentando vacuolização, morte ou fragmentação, cores atípicas, tamanho de massa celular irregular, falta de compactação da zona pelúcida (tabela 3) (Barfield; Demetrio, 2022; Viana 2023).

Tabela 3 - Classificação de qualidade dos embriões de acordo com o Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões.

Código	Classificação de Qualidade	Características
Código 1	Excelente ou bom	<p>Massa embrionária simétrica e esférica com blastômeros (células) uniformes em densidade, cor e tamanho. As irregularidades devem ser relativamente menores. As células do trofotoderma devem ter cor clara e tamanho uniforme. A ICM deve ser cada vez mais compacta ao passo que o desenvolvimento do embrião progride. Embriões com pequenas deformidades da zona pelúcida (ZP) que não tenham outras deficiências podem ser classificados como grau 1.</p>
Código 2	Razoável	<p>Irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade de células individuais. Pelo menos 50% do material celular deve fazer parte de uma massa embrionária intacta e viável. Defeitos menores da ICM ou trofotoderma podem ser aceitáveis, porém não em ambos. Os defeitos do ICM podem incluir má organização, má compactação ou aparência salpicada/densa de células individuais. Os defeitos da trofotoderma podem incluir células de tamanho irregular, células excessivamente densas agrupadas ou dispersas ou irregularidades na forma da cavidade da blastocele.</p>
Código 3	Ruim	<p>Grandes irregularidades na forma da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade de células individuais são observadas. Ao menos 25% do material celular deve fazer parte da massa embrionária intacta e viável. Verificam-se defeitos importantes tanto na ICM quanto na trofotoderma. Embriões de baixa qualidade podem não ter uma ICM facilmente diferenciável ou ter poucas células de densidades variadas que compõem uma ICM mal organizada.</p>
Código 4	Degenerado	<p>Óvulos não fertilizados e embriões que pararam de se desenvolver nos estágios de clivagem são considerados inviáveis se as avaliações forem feitas 7 dias após a fertilização <i>in vitro</i>. Os blastômeros</p>

podem parecer granulados e o citoplasma pode estar se distanciando da membrana plasmática. Nenhuma massa embrionária viável é identificável.

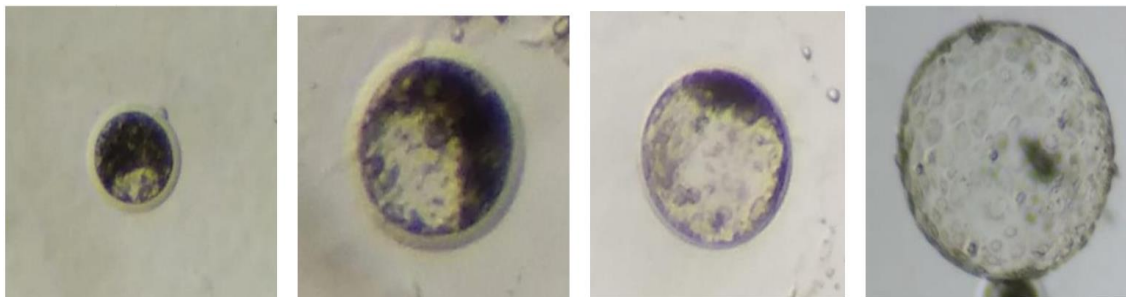
Fonte: Adaptado de Viana, 2023.

3.3 Transferência de embriões

De acordo com Viana *et al.*, (2017), as primeiras transferências de embriões de bovinos *in vitro* no Brasil foram realizadas no ano de 2009, tendo impacto positivo na bovinocultura, principalmente em programas de melhoramento dos rebanhos de leite e corte. Através da TE é possível encurtar o intervalo de partos, além de proporcionar maior controle de doenças, melhora da fertilidade das doadoras, pode ser utilizada para realizar crescimento de linhagens raras, acelera o progresso genético como também facilita o teste de progênie em fêmeas (Erdem *et al.*, 2020; Hafez *et al.*, 2004).

Antes de realizar as transferências de embriões, avaliaram as etapas de desenvolvimento embrionário (Figura 10). O cultivo desses embriões foi feito em condições iguais aos da fecundação e após uma semana de cultivo os blastócitos foram classificados de acordo com seu estágio de desenvolvimento (blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) e envasados para a posterior transferência (Grázia e Santos, 2021).

Figura 10 - Fotografias de embriões bovinos em vários estágios de desenvolvimento. Blastocisto inicial (Bi), blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX) e blastocisto eclodido (BE), respectivamente.



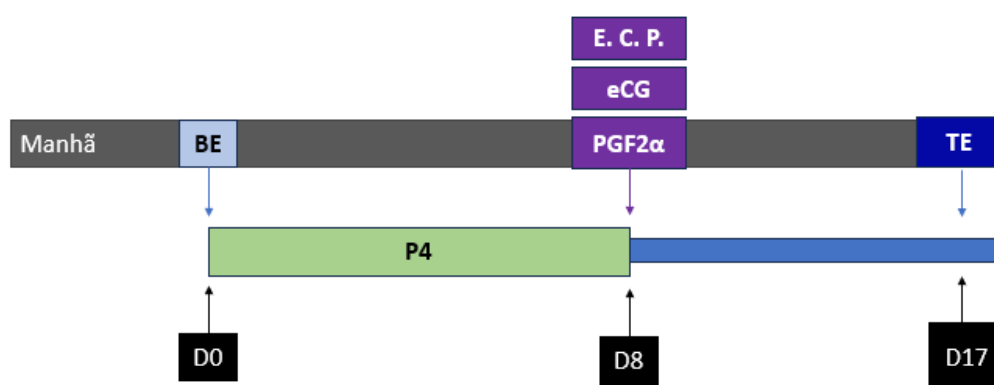
Fonte: Grázia e Santos, 2021.

Na Transferência de embriões são utilizados alguns protocolos com a finalidade de protagonizar o superestímulo para potencializar o número de

óocitos e embriões transferíveis, conseguindo uma alta significativa de gestação de fêmeas receptoras (Santos, 2017). As doadoras podem ser superovuladas a cada 60 dias entre duas coletas, segundo os autores para se obter resultados satisfatórios é aconselhável que o procedimento seja realizado por até 2 anos (Pazzim, 2021).

Grázia e Santos (2021) realizaram estudo sobre avaliação do estágio de desenvolvimento embrionário na taxa de prenhez em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*, para a transferência de embriões eles realizaram os seguintes métodos, seleção dos animais, no qual os selecionados foram submetidos o protocolo de sincronização do ciclo estral nas fêmeas receptoras (Figura 11). No primeiro dia inseriram um dispositivo intravaginal de 1g de progesterona e aplicação intramuscular de 2mL de benzoato de estradiol. No oitavo dia, retiraram esse dispositivo juntamente com aplicação intramuscular de 2mL de gonadotrofina coriônica equina (eCG), 2mL de prostaglandina F2 α (PGF2 α) e 0,5mL de cipionato de estradiol. A transferência de embriões foi realizada no 17 $^{\circ}$ dia, onde foi realizado um exame de ultrassonografia, para observar o corpo lúteo e o lado que a ovulação aconteceu, para elas poderem receber a transferência de embriões cada receptora foi anestesiada.

Figura 11 – Protocolo de sincronização das receptoras.



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Trenkel (2022) avaliou a gestação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, foram realizadas 419 transferências de embriões, tendo uma taxa de

29,04% de gestação. Esses valores encontrados divergem de alguns autores, que reportam percentual de transferências de embriões, acima de 50% (Scanave, 2013). Também foi avaliado a taxa de gestação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, a partir de seu estágio de desenvolvimento (Tabela 4). Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) em raças de corte após a TE nos estádios de desenvolvimento de blastocisto e blastocisto expandido, como também não foram observadas mudanças significativas na raça Holandesa nos estádios de desenvolvimento de mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido (Trenkel, 2022).

Tabela 4 - Taxa de gestação de embriões bovinos, de raças de corte e leite, produzidos *in vitro*, de acordo com o estágio de desenvolvimento do embrião.

Estádio de desenvolvimento do embrião	Nº de embriões de corte	Nº de embriões de Leite	TAXA DE GESTAÇÃO (%)	
			Corte	Leite
MO	-	08	-	37,50 ^A
BI	-	33	-	15,63 ^A
BL	42	42	31,63 ^a	25,00 ^A
BX	203	66	23,08 ^a	20,83 ^A
Valor de p			0,2240	0,2240

Fonte: Trenkel, 2022.

3.4. Criopreservação de embriões

A criopreservação de embriões é uma técnica que facilita o armazenamento e transferência de blastocistos de alto mérito genético, comumente são utilizadas as duas principais metodologias que é o congelamento lento e a vitrificação, que foram desenvolvidas com a finalidade de se evitar crioinjúrias, (Silva Júnior, 2022).

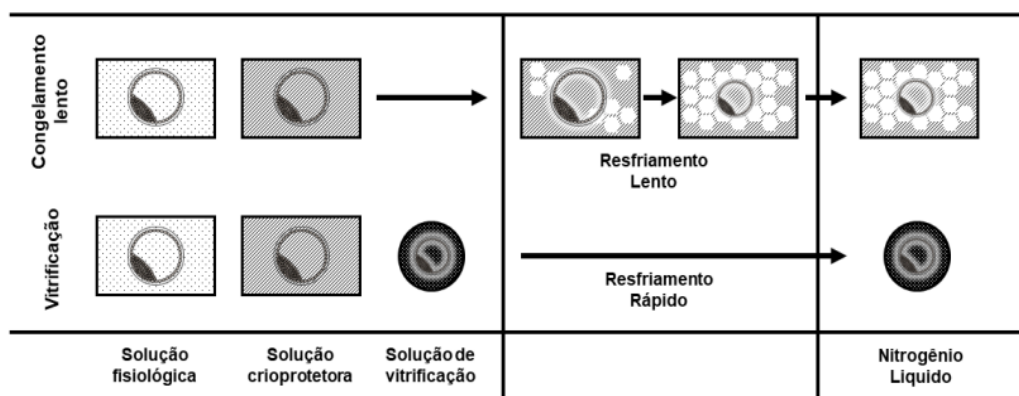
A Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), relata que mais de 50% dos embriões bovinos, foram submetidos a essa técnica. Porém um entrave da criopreservação em embriões *in vitro* que eles são sensíveis a redução abrupta de temperatura (Gonçalves, 2016).

A estrutura do embrião bovino apresenta em média 90 células, revestidas por uma forte membrana denominada zona pelúcida, tornando a criopreservação mais complexa porque se houver danos nessas células o processo torna-se irrecuperável, principalmente se atingir algum tipo celular específico, como a massa celular interna ou trofotoderma (Oliveira; Sarapião; Quintão, 2014).

O congelamento lento tem como princípio, viabilizar o congelamento do meio externo ao embrião, promovendo desidratação gradual do blastocisto até que o mesmo atinja a temperatura de vitrificação da matriz intracelular, a temperatura é diminuída gradualmente através de uma curva de -0.3 a -0.5 °C/minuto, até atingir temperaturas da ordem de -30 a -65 °C, quando as palhetas são imersas em nitrogênio líquido (Vajta; Nagy, 2006).

A vantagem dessa forma de congelamento é usar baixas concentrações de crioprotetores, que quando usado em grandes quantidades pode acarretar em toxicidade química e choque osmótico. Na (figura 12) pode se observar o comportamento embrionário submetido aos dois métodos o de congelamento lento e a vitrificação, tendo por finalidade evitar que se formem cristais de gelo intracelular, lesões osmóticas e toxicidade dos crioprotetores (Dode; Leme; Sprícigo, 2013; Arav, 2014).

Figura 12 - Representação esquemática de um embrião durante os métodos de congelamento lento e vitrificação. Os hexágonos brancos representam os cristais de gelo. A concentração de crioprotetores é a parte escura do sombreamento.



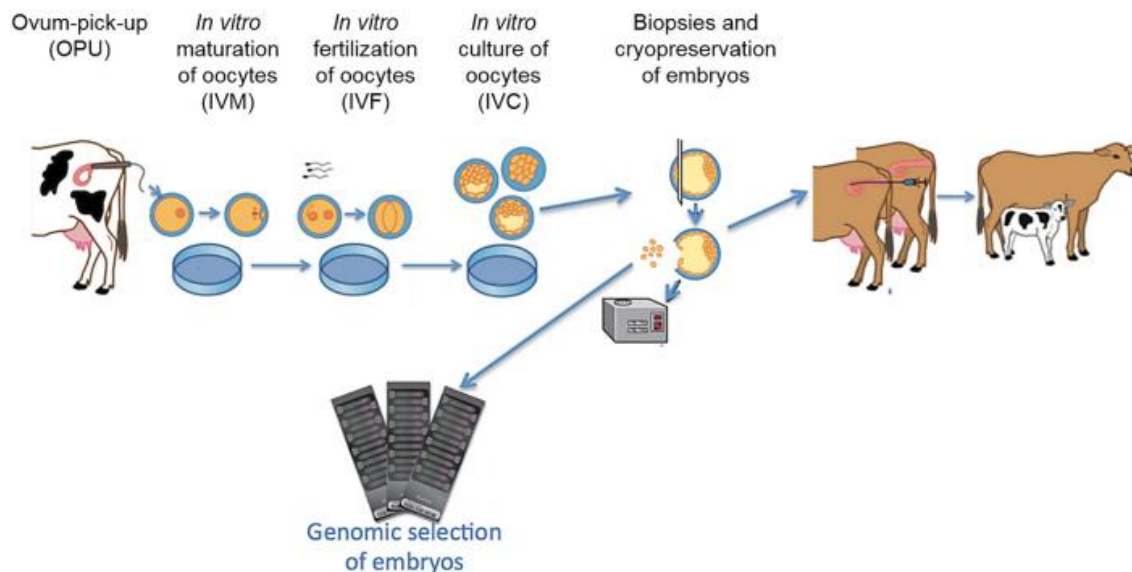
Fonte: Adaptado de Moawad, 2010.

De acordo com Vajta e Nagy, (2006), no processo de vitrificação usa-se altas concentrações de crioprotetores, que durante o processo de resfriamento, formam uma solução viscosa fazendo que a água da célula se solidifique em estado vítreo, entretanto sem que haja formação de cristais de gelo.

A congelação rápida tem como base a desidratação do embrião utilizando soluções osmóticas, induzindo a diminuição drástica da temperatura embrionária, transpondo a etapa de cristalização (Oliveira; Sarapião; Quintão, 2014).

Ferré *et al.* (2020) utilizou de várias ferramentas para fazer uma melhor seleção de animais dentre elas a criopreservação, esse estudo observou ganho e progresso genético acelerado e as etapas do processo para a seleção genética dos embriões (Figura 13).

Figura 13 - Fluxo do processo de coleta de óvulos (OPU) de *Bos indicus* e *Bos taurus*, maturação *in vitro* (MIV) de oócitos, fertilização *in vitro* (FIV), cultura *in vitro* (CIV) de embriões, coleta de biópsias, seleção genômica usando marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) e criopreservação.



Fonte: Ferré *et al.*, 2020.

3.5 Características de embriões produzidos *in vitro*

São indiscutíveis os avanços para se produzir embriões *in vitro*, porém algumas características limitantes ainda são apresentadas, tais como: baixos

índices de blastocistos, baixa viabilidade dos oócitos, aspectos morfológicos, aspectos metabólicos, menor número de células e maior sensibilidade a criopreservação. Essas diferenças entre embriões produzidos *in vitro* e os produzidos *in vivo*, possivelmente, são as responsáveis pela redução na eficiência da técnica, PIV (EMBRAPA, 2021).

Devido a sensibilidade a criopreservação os embriões devem ser transferidos a fresco, para ter taxa de prenhez desejável (Mello *et al.*, 2016), nesse sentido para minimizar essas limitações, os pesquisadores estão cada vez mais se aprofundando no estudo da técnica como por exemplo, a adição de agentes antioxidantes (L-ergotioneína ou dimetilglicina) aos meios de cultura promoveu a melhora da qualidade de embriões bovinos e maior resistência à criopreservação (Takahashi *et al.*, 2016). São constantes os estudos para aprimorar as técnicas, atualmente os custos elevados para o tratamento hormonal e à oscilação na oferta de Hormônio Folículo-estimulante (FSH) que é necessário para a superovulação (SOV) e produção *in vivo*, faz com que a PIV venha crescendo gradativamente na produção de embriões, mesmo a produção *in vivo* sendo bem estabelecida, ela está sendo superada pela PIV em número de embriões produzidos desde o ano de 2015 (Viana, 2022).

Lima *et al.*, (2023) avaliando os Desafios e perspectivas na produção comercial de embriões *in vivo* e *in vitro* de raças taurinas e sintéticas observaram que, a PIV tem sido utilizada principalmente para raças sintéticas, compostas por cruzamentos de raças taurinas e zebuínas, e para a raça Holandês, sendo a PIV é mais viável nesses casos, porque essas raças tem maior número de folículos aspirável, advindo do cruzamento com zebuínos, como exemplo dessas raças temos: Brangus e Braford.

No cenário atual, ainda se faz necessário ainda o uso das duas técnicas de forma sincronizada na produção de raças taurinas e sintéticas (Lima *et al.*, 2023).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É crescente a utilização de biotécnicas de reprodução para bovinos, devido os avanços serem inegáveis, elas permitem a elevação da eficiência produtiva e reprodutiva do rebanho, ao longo dos anos e com o

aperfeiçoamento das técnicas a participação da fêmea bovina foi maior, tanto no aumento de descendentes como no processo de melhoramento genético do rebanho.

No entanto sabemos que a produção de embriões de bovinos *in vitro*, ainda requer mais estudos, mesmo apresentando resultados satisfatórios, as pesquisas devem ser ampliadas, no intuito de elevar o máximo possível a taxa de prenhez, como também reduzir os custos para se produzir embriões, para que ela fique acessível ao maior número de criadores.

Espera-se que em breve essa biotecnologia seja utilizada de forma mais ampla nos rebanhos comerciais, sabendo que o Brasil é exportador potencial de carne bovina, e que gere ganhos consideráveis aos criadores pelo aproveitamento do potencial genético de seus animais em curto espaço de tempo, além dos avanços de grande impacto para a área acadêmica.

REFERÊNCIAS

ABDEL-GHANI, M. A. *et al.* Effects of pre-maturational culture duration on developmental competence of bovine small-sized oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 64, n. 4, p. 365-369, 2018. DOI 10.1262/JRD.2018-004. Disponível em: <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-004>. Acesso em: 31 out. 2023.

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. **Beef Report 2023**. 2023. Disponível em: https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023-capitulo-01/#dfliip-df_53277/. Acesso em: 11 out. 2023.

ADRIKARI, D. *et al.* Oocyte mitochondria—key regulators of oocyte function and potential therapeutic targets for improving fertility. **Biology of Reproduction**, v. 106, n.2, p. 366-377, 2022. DOI 10.1093/biolre/ioac024. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioac024>. Acesso em: 30 out. 2023.

ALI, S. Advances in bovine follicular aspiration technique. **World Scientific News**, v. 157, p. 169-188, 2021. Disponível em: www.worldscientificnews.com. Acesso em: 01 nov. 2023.

ANGUITA, B. *et al.* Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepuberal goat oocytes. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 526-536, 2007. DOI 10.1016/j.theriogenology.2006.09.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.003>. Acesso em: 08 out. 2023.

ARAV, A. Cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**, v. 81, p. 96-102, 2014.

BARFIELD, J.; DEMETRIO, D. Considerations for evaluating in vitro-produced bovine embryos. In: **Manual of the International Embryo Transfer Society**, 5th Edition. IETS, 2022. Acesso em 23 out. 2023.

BARROZO, E. L. S.; NASCIMENTO, V. A.; DIAS, M. Produção de embriões *in vitro* com sêmen sexado de touros nelore. **Revista Agrária Acadêmica**, v. 5, n. 3, p. 49-58, 2022. DOI 10.32406/v5n3/2022/49-58/agrariacad. Disponível em: <https://doi.org/10.32406/v5n3/2022/49-58/agrariacad>. Acesso em: 07 out. 2023.

BARUSELLI, P. S. *et al.* Genetic market in cattle (Bull, AI, FTAI, MOET and IVP) financial payback based on reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 247-255, 2018a. DOI 10.21451/1984-3143-AR2018-0091. Disponível em: <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0091>. Acesso em: 09 out. 2023.

BARUSELLI, P. *et al.* Assisted reproductive technologies (ART) in water buffaloes. **Animal Reproduction**, v.15, n.1, p.971-983, 2018b. DOI 10.21451/1984-3143-AR2018-0043. Disponível em: <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0043>.

84-3143-AR2018-0043. Acesso em: 27 out. 2023.

BARUSELLI, P. S. *et al.* Challenges to increase the AI and ET markets in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 364-375, 2019. DOI 10.21451/1984-3143-AR2019-0050. Disponível em: <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0050>. Acesso em: 10 out. 2023.

BECHER, B. G. *et al.* Fatores que afetam a produção *in vitro* de embriões (PIVE) em bovinos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 15, n. 28, p. 554-570, 2018. Disponível em: <https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/421>. Acesso em: 09 out. 2023.

BIORENDER. Disponível em: <https://biorender.com/>. Acesso em: 15 out. 2023.

CARNEIRO, I. M. B. *et al.* Oócitos bovinos: influência das estações do ano e maturação *in vitro* em meio enriquecido com quercetina. **Magistra**, v. 30, p. 134-142, 2019. Disponível em: <https://www3.ufrb.edu.br/magistra/index.php/magistra/article/view/652>. Acesso em: 12 out. 2023.

CARVALHO, V. H. S.; CARMO, R. B.; PINTO, S. C. C. Impacto das biotécnicas da reprodução animal e o melhoramento genético na pecuária de corte. **PUBVET**, v.17, n. 8, e1427, p. 1-10, 2023. DOI 10.31533/pubvet.v17n8e1427. Disponível em: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v17n8e1427>. Acesso em: 10 out. 2023.

COMIZZOLI, P.; PAULSON, E. E.; MCGINNIS, L. K. The mutual benefits of research in wild animal species and human-assisted reproduction. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 35, n. 4, p. 551-560, 2018. DOI 10.1007/s10815-018-1136-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1136-2>. Acesso em: 14 out. 2023.

DODE, M. A. N.; LEME, L. O.; SPRÍCIGO, J. F. W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 145-150, 2013. Disponível em: <https://www.cbra.org.br>. Acesso em: 18 out. 2023.

EALY, A. D; WOOLDRIDGE, L. K; McCOSKI, S. R. Board invited review: Post-transfer consequences of *in vitro*-produced embryos in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 6, p. 2555-2568, 2019. DOI 10.1093/jas/skz116. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jas/skz116>. Acesso em: 20 out. 2023.

EDWARDS, R. G. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. **Nature**, v. 208, n. 5008, p. 349-351, 1965. DOI 10.1038/208349a0. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/208349a0>. Acesso em: 20 out. 2023.

EMBRAPA. *in vitro* **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Laboratório de Reprodução Animal**, 2021.

ERDEM, H. *et al.* Effect of embryo quality and developmental stages on pregnancy rate during fresh embryo transfer in beef heifers. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, p. 2541-2547, 2020. DOI 10.1007/s11250-020-02287-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02287-6>. Acesso em: 07 out. 2023.

FEIJÓ, A. L. S. **Segregação de células somáticas seminais de bovinos e ovinos frente a diferentes diluentes para resfriamento e congelamento de sêmen**. 2022. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2022.

FERREIRA, E. M. *et al.* Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836-848, 2009. DOI 10.1016/j.theriogenology.2008.10.023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.023>. Acesso em: 10 out. 2023.

FERRÉ, L. B. *et al.* Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal**, v. 14, n. 5, p. 991-1004, 2020. DOI 10.1017/S1751731119002775. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>. Acesso em: 12 out. 2023.

GALLEGOS, F. *et al.* Bovine *in vitro* embryo production: State of the art. **ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of S.T.E.A.M.**, v. 2, n. 1, p. 172-185, 2022. DOI 10.18502/epoch.v2i2.11192. Disponível em: <https://doi.org/10.18502/epoch.v2i2.11192>. Acesso em: 28 out. 2023.

GONÇALVES, P. B. D. *et al.* Produção *in vitro* de embriões. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª edição. São Paulo: Roca, 2016.

GRÁZIA, J. G. V.; SANTOS, G. M. Avaliação do estágio de desenvolvimento embrionário na taxa de prenhez em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 3, p. 4776-4782, 2021. DOI 10.34188/bjaerv4n3-153. Disponível em: <https://doi.org/10.34188/bjaerv4n3-153>. Acesso em 15 out. 2023.

GUARDA, A. C. A. **Biotecnologia na reprodução animal: Uma visão teórico/prática de produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2023. 28 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Zootecnia) - Instituto Federal Goiano, Rio Verde, 2023.

GUTIÉRREZ-AÑEZ, J. C. *et al.* Melatonin enhances *in vitro* developmental competence of cumulus-oocyte complexes collected by ovum pick-up in prepubertal and adult dairy cattle. **Theriogenology** v. 161, p. 285-293, 2021. DOI 10.1016/j.theriogenology.2020.12.011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.12.011>. Acesso em: 30 out. 2023.

HAFEZ, E. S. E. *et al.* **Reprodução Animal**. Coordenador de tradução da 7 ed. Original Renato Campanarut Barnabe, Barueri, São Paulo, Manole, 2004. Tradução de *Reproduction in farm animals*.

HASHIMOTO, S. *et al.* Mitochondrial function in immature bovine oocytes is improved by an increase of cellular cyclic AMP. **Scientific Reports**, v. 9, n. 5167, 2019. DOI 10.1038/S41598-019-41610-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/S41598-019-41610-6>. Acesso em: 31 out. 2023.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa da Pecuária Municipal**. PPM –2021. Sistema IBGE de Recuperação Automática –SIDRA, 2022. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/cnt/brasil>. Acesso em: 10 out. 2023.

IVANOV, D. *et al.* Melatonin, its beneficial effects on embryogenesis from mitigating oxidative stress to regulating gene expression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, 5885, 2021. DOI 10.3390/ijms22115885. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22115885>. Acesso em: 30 out. 2023.

JELONSCHEK, J. P. *et al.* Fatores que afetam a taxa de gestação de receptoras de embriões produzidos *in vitro*. Revisão de literatura. **Scientific Eletronic Archives**, v. 11, n. 6, 2018. Acesso 31 out. 2023.

JIANG, Y. *et al.* Applications of melatonin in female reproduction in the context of oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 6668365, 2021. DOI 10.1155/2021/6668365. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2021/6668365>. Acesso em: 30 out. 2023.

KIRILLOVA, A. *et al.* 2021. The role of mitochondria in oocyte maturation. **Cells**, v.10, n.9, 2484. DOI 10.3390/cells10092484. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells10092484>. Acesso em: 30 out. 2023.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 1, p. 76-86, 1979. DOI 10.2527/jas1979.48176x. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/jas1979.48176x>. Acesso em: 27 out. 2023.

LIMA, W.M; *et al.* Desafios e perspectivas na produção comercial de embriões in vivo e in vitro de raças taurinas e sintéticas. **Rev Bras Reprod Anim**, v.47, n.2, p.234-237, abr./jun. 2023. Acesso em: 01 nov. 2023.

LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of oocytes in vitro. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 255-268, 2016. DOI 10.1146/annurev-animal-022114-110822. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110822>. Acesso em: 30 out. 2023.

LUCIANO, A.M.; SIRARD, M.A. Sucessful *in vitro* maturation of oocytes: a matter of follicular differentiation. **Biology of Reproduction**, v. 98, n. 2, p. 162-169, 2018. DOI 10.1093/biolre/iox149. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biolre/iox149>. Acesso em: 29 out. 2023.

LUEDKE, F. E. *et al.* Aspectos da produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil – revisão. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 25, n. 1/2, p. 120-132, 2019. DOI 10.36812/pag.2019251/2120-132. Disponível em: <https://doi.org/10.36812/pag.2019251/2120-132>. Acesso em: 18 out. 2023.

MALAFAIA, G. C.; AZEVEDO, D. B.; PEREIRA, M. A.; MATIAS, M. J. A. **A sustentabilidade na cadeia produtiva da pecuária de corte brasileira**. In: BUNGENSTAB, D. J.; ALMEIDA, R. G.; LAURA, V. A.; BALBINO, L. C.; FERREIRA, A. D. (Ed.). *ILPF: inovação com integração de lavoura, pecuária e floresta*. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 835 p.

McLAUGHLIN, M. *et al.* Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multi-step culture system. **Molecular Human Reproduction**, v. 24, n. 3, p. 135-142, 2018. DOI 10.1093/molehr/gay002. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molehr/gay002>. Acesso em: 31 out. 2023.

MEITEI H. Y. *et al.* A simple, centrifugation-free, sperm-sorting device eliminates the risks of centrifugation in the swim-up method while maintaining functional competence and DNA integrity of selected spermatozoa. **Reproductive Sciences**, v. 28, p. 134-143, 2021. DOI 10.1007/s43032-020-00269-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s43032-020-00269-5>. Acesso em: 31 out. 2023.

MELLO, R. R. C. *et al.* Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 2, p. 58-64, 2016. Disponível em www.cbra.org.br. Acesso em: 31 out. 2023.

MOAWARD, A. R. **Cryopreservation of ovine oocytes**. (Doutorado) Ciência Animal, Universidade de Nottingham. 2010. Acesso em: 02 nov. 2023.

NAVARRO-SERNA, S. *et al.* Replacement of albumin by preovulatory oviductal fluid in swim-up sperm preparation method modifies boar sperm parameters and improves *in vitro* penetration of oocytes. **Animals**, v. 11, n. 5, 1202, 2021. DOI 10.3390/ani11051202. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani11051202>. Acesso em: 31 out. 2023.

OLIVEIRA, C. S.; SARAPIÃO, R. V.; QUINTÃO, C. C. R. **Biotécnicas da Reprodução em Bovinos**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2014. 54 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 175).

OVÍDIO, H. **As biotecnologias da reprodução como propulsoras do melhoramento genético animal na bovinocultura de corte – Revisão de literatura**. 2022. 18 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) - Universidade Brasil, Fernandópolis, 2022.

PANG, Y. *et al.* Protective effects of melatonin on the *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. **Animal Science Journal**, v. 89, n. 4, p. 648-660, 2018. DOI 10.1111/asj.12970. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/asj.12970>. Acesso em: 30 out. 2023.

PASSOS, E. P. History of assisted reproduction: lessons learnt and future challenges. **Reviews in Gynaecological Practice**, v. 4, n. 4, p. 199-202, 2004. DOI 10.1016/j.rigp.2004.04.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rigp.2004.04.003>. Acesso em: 12 out. 2023.

PAZZIM, L. V. L. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS: REVISÃO DE LITERATURA. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, 2021.

PETRY, J. C. *et al.* **Boletim Técnico 52**: Aspiração folicular ovariana e classificação de oócitos bovinos. Descalvado, Sp: Produção Animal Universidade Brasil, 2019. Disponível em: https://universidadebrasil.edu.br/port al/_biblioteca/uploads/20210414205046.pdf. Acesso em: 12 out. 2023.

RAHMAN, M. S.; KWON, W. S.; PANG, M. G. Prediction of male fertility using capacitation-associated proteins in spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, n. 9, p. 749-759, 2017. DOI 10.1002/mrd.22810. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.22810>. Acesso em: 18 out. 2023.

RAKHA, S. I. *et al.* Importance of antioxidant supplementation during *in vitro* maturation of mammalian oocytes. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 8, 439, 2022. DOI 10.3390/vetsci9080439. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vetsci9080439>. Acesso em: 19 out. 2023.

SANTOS, G. M. **Transferência de embriões**. Viçosa: Cpt, 2017.

SILVA JUNIOR, R. A. Avaliando os efeitos das proteínas, anticongelantes na viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* vitrificados. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2022. Acesso em: 02 nov. 2023.

SILVA, A. E. *et al.* Aspiração folicular em bovinos: Revisão. **Sinapse Múltipla**, v. 10, n. 1, p. 28-30, 2021. Disponível em: <https://periodicos.pucminas.br/index.php/sinapsemultipla/article/view/26653>. Acesso em: 10 out. 2023.

SIQUEIRA, A. F. P. *et al.* Sperm traits on *in vitro* production (IVP) of bovine embryos: Too much of anything is good for nothing. **Plos One**, v. 13, n. 7, e0200273, 2018. DOI 10.1371/journal.pone.0200273. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200273>. Acesso em: 30 out. 2023.

SJUNNESSON, Y. *In vitro* fertilisation in domestic mammals—a brief overview. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 125, n. 2, p. 68-76, 2020. DOI 10.1080/03009734.2019.1697911. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/03009734.2019.1697911>. Acesso em: 14 out. 2023.

SOTO-HERAS, S.; PARAMIO, M. T. Impact of oxidative stress on oocyte competence for *in vitro* embryo production programs. **Research in Veterinary Science**, v. 132, p. 342-350, 2020. DOI 10.1016/j.rvsc.2020.07.013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.013>. Acesso em: 30 out. 2023.

SOUZA, L. C. B. **PIVE e IATF aplicadas à reprodução de bovinos de corte**. 2020. 40 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Zootecnia) - Escola de Ciências Agrárias e Biológicas da Pontífica Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2020.

SOUZA-CÁCARES, M. B. *et al.* Oocyte quality and heat shock proteins in oocytes from bovine breeds adapted to the tropics under different conditions of environmental thermal stress. **Theriogenology**, v. 130, p. 103-110, 2019. DOI 10.1016/j.theriogenology.2019.02.039. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.039>. Acesso em: 28 out. 2023.

SPECKHART, S. L.; WOOLDRIDGE, L. K.; EALY, A. D. An updated protocol for *in vitro* bovine embryo production. **Star Protocols**, v. 4, n. 1, 101924, 2023. DOI 10.1016/j.xpro.2022.101924. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101924>. Acesso em: 15 out. 2023.

STROUD, B.; CALLESEN, H. IETS statement on worldwide ET Statistics for 2010. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 210-216, 2012. Acesso em: 01 nov. 2023.

TAKAHASHI, T. *et al.* N, N-Dimethylglycine decreases oxidative stress and improves *in vitro* development of bovine embryos. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 62, n. 2, p. 209-212, 2016. DOI 10.1262/jrd.2015-149. Disponível em: <https://doi.org/10.1262/jrd.2015-149>. Acesso em: 17 out. 2023.

TRENKEL, C. K. G. GESTAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO ORIUNDOS DE RAÇAS DE CORTE E LEITE. **Trabalho de Conclusão de curso**. Universidade Federal da Fronteira do Sul, 2022. Acesso em 01 nov. 2023.

VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 12, n. 6, p. 779-796, 2006. DOI 10.1016/s1472-6483(10)61091-7. Disponível em: [https://10.1016/s1472-6483\(10\)61091-7](https://10.1016/s1472-6483(10)61091-7). Acesso em: 19 out. 2023.

VIANA JHM, *et al.* Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Anim Reprod**, v.14, p.476-481, 2017.

VIANA, J. H. M. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, v. 40, n. 4, 2022.

VIANA, J. H. M. *et al.* A historical perspective of embryo-related technologies in South America. **Animal Reproduction**, v.15, p.963-970, 2018. DOI 10.21451/1984-3143-AR2018-0016. Disponível em: <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0016>. Acesso em 15 out. 2023.

VIANA, J. H. M. Classificação de embriões bovinos produzidos *in vivo*. **Artigo Técnico**, 2023. Disponível em:

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/982665/1/Classificacao-de-embrioes-bovinos-produzidos-invivo.pdf>. Acesso em 01 nov. 2023.

WANG, J. et al. Heat stress on calves and heifers: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 11, n. 79, 2020. DOI 10.1186/s40104-020-00485-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40104-020-00485-8>. Acesso em: 28 out. 2023.

XIE, Y. *et al.* Sex manipulation technologies progress in livestock: A review. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, n.481, 2020. DOI 10.3389/fvets.2020.00481. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00481>. Acesso em: 31 out. 2023.

YANAGIMACHI, R.; CHANG, M. C. Fertilization of hamster eggs *in vitro*. **Nature**, v. 200, n. 4903, p. 281-282, 1963. DOI 10.1038/200281b0. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/200281b0>. Acesso em: 07 out. 2023.