



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS



CURSO DE ZOOTECNIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

AVANÇOS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Discente: **Cleidiane Andrade dos Santos**

Orientador: **Profº Dr. José Ribamar de Souza Torres Júnior**

Chapadinha, MA

2017

CLEIDIANE ANDRADE DOS SANTOS

AVANÇOS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado para a obtenção do título de Zootecnista
junto a Universidade Federal do Maranhão, Campus
Chapadinha.

Orientador: **Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres Júnior**

Co-orientador: **Me. Diego Luiz dos Santos Ribeiro**

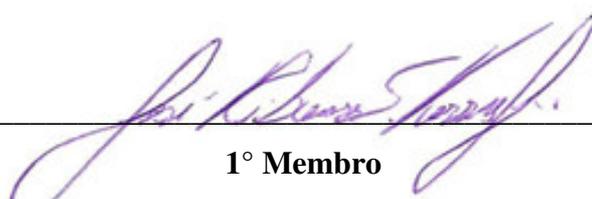
Chapadinha, MA

2017

CLEIDIANE ANDRADE DOS SANTOS

Trabalho de conclusão de Curso de graduação defendido e aprovado em 31 de janeiro de 2017, pela seguinte Banca Examinadora:

Aprovada 31 de janeiro de 2017



1° Membro

Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres Júnior

Universidade federal do Maranhão -UFMA

Presidente da banca



2° Membro

Me. Diego Luiz dos Santos Ribeiro

Universidade Estadual do Maranhão – UEMA



3° Membro

Me. Itamara Gomes de França

Universidade Federal do Maranhão - UFMA

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de cursar um ensino superior, e me dar a dádiva de concluí-lo com honestidade, guiando-me nos momentos difíceis encontrados durante toda a graduação.

Agradeço aos meus pais Francisco Andrade Silva, Eva dos Santos, e Luiza Andrade Silva, por tudo que fizeram e fazem por mim, pela educação que tive, porque se não fosse isso não teria chegado até aqui, agradeço por todo amor e apoio que recebi.

Agradeço os meus familiares que me apoiaram nessa jornada e me ajudaram bastante, de todas as formas que puderam, principalmente minha irmã Gleyca, que sempre me ajudou, agradeço também minhas irmãs Leiliany e Ana Heloisa. Agradeço o meu cunhado Bruno, minha vó Maria das Graças e minha prima-irmã Leticia.

Agradeço de forma especial e grandiosa meu professor e orientador Dr. José Ribamar de Souza Torres Júnior, que teve paciência em me orientar com carinho, demonstrando sempre muita competência no que faz, agindo com sabedoria, forma na qual me ensinou a ter responsabilidades. Sou grata também ao meu co-orientador Diego Ribeiro que se dispôs a me ajudar nessa jornada.

Aos meus amigos que me apoiaram e ajudaram sempre que necessário e que sempre esteve junto nessa jornada desde o início da graduação, agradeço a todos os professores que ministraram aula durante minha vida acadêmica em destaque professora Dr^a Jane Melo Lopes.

RESUMO

Avanços da Produção *In Vitro* de Embriões Bovinos

(Advances on In Vitro Production of Bovine Embryos)

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos apresentam avanços, principalmente no Brasil devido as condições favoráveis a essa técnica, que visa melhorar significativamente a disseminação de animais com mérito genético. Através dos avanços científicos, a PIVE já se tornou uma técnica mundial, e com a atualização da ciência, os embriões produzidos *in vitro* já alcançaram resultados próximos aos produzidos *in vivo*, embora ainda existam muitos entraves. A viabilidade econômica do sistema de produção de embriões está relacionada com a taxa de blastocisto. Para atingir as melhores taxas possíveis, pesquisas demonstraram que, a qualidade do complexo *cumulus*-oócito (CCOs) é de grande importância, devido a ligação que existe entre as células, principalmente com relação ao papel de nutrição do oócito, realizado pelas células do *cumulus* responsáveis pela maturação oocitária. A maturação, fertilização e cultivo é uma técnica bem definida, onde ambas as etapas são realizadas em estufa nas mesmas condições de temperatura e composição do ar, com temperatura de 39° C, atmosfera controlada (5% de CO₂ 5% de O₂ 90% N₂) e saturada, afim de simular as condições naturais em que ocorreria esse processo. Os meios utilizados para cada etapa é diferente, na maturação se utiliza o fluido folicular e TCM 199, a capacitação do espermatozoide, é realizada através da técnica de gradiente percoll ou swim-up. O meio de fertilização em maior uso é o FERT-TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato). A maturação é a primeira etapa da PIVE sendo realizada em estufa, embora existam outros sistemas alternativos, os meios mais descritos foram a albumina sérica bovinos (BSA) e o fluido sintético do oviduto (SOF) podendo ser suplementada com outros compostos. O uso de soro durante o cultivo, é limitado devido o surgimento de patologia como síndrome do bezerro grande (LOS) embora seu uso ainda é favorável com nível até de 5% de inclusão, podendo também ser substituído pela albumina sérica bovinos (BSA) na maioria dos laboratórios. A PIVE visa maximizar o aproveitamento dos CCOs da fêmea, podendo gerar através dessa técnica até 311 gestações de uma única fêmea. A nova técnica TIFOI é promissora, quando se fala de redução de custo da PIVE, utilizando o próprio animal como laboratório. Portanto mais pesquisas estudos sobre os mecanismos moleculares durante o desenvolvimento embrionário inicial, e as interações de meios de cultura, são necessárias, para maximizar a quantidade de blastocisto quanto a qualidade melhorando a viabilidade da técnica.

Palavra-chave: OPU-FIV, aspiração folicular, maturação, fertilização e cultivo.

ABSTRACT

Advances on In Vitro Production of Bovine Embryos

The in vitro production (IVP) of bovine embryos shows advances, mainly in Brazil, due to favorable conditions for this technique, which aim to improve the dissemination of animals with genetic merit. Through scientific advances, a IVP of bovine embryos has already become a worldwide technique with an update of science, the embryos produced in vitro and have already achieved results similar to those produced in vivo, although there are still many obstacles. The economic viability of the embryo production system is related to a blastocyst rate. To achieve the best possible rates, research has shown that the quality of the cumulus-oocyte complex (COCs) is of great importance because of a link between cells, especially in relation to the role of oocyte nutrition. The maturation, fertilization and culture is a well defined technique, where both are carried out under the same conditions of temperature and composition, with a temperature of 39 ° C, controlled atmosphere (5% CO₂ 5% O₂ 90% N₂) and saturated, To simulate the natural conditions in which this process occurs. Goals used for each different stage, in maturation if follicular fluid is used and TCM 199, a sperm training, is performed using the percoll or swim-up gradient technique. The most widely used fertilizer is FERT-TALP (Tyrode-albumin-lactate-pyruvate). Maturation is a last stage of the (IVP) of bovine embryos that takes place in an oven, although there are other alternative systems, the most suitable means for bovine serum albumin (BSA) and the synthetic fluid of the oviduct (SOF), which can be supplemented with other compounds. The use of serum during culture is limited due to the appearance of pathology such as the large calf syndrome (LCS) although its use is still favorable with a level of up to 5% of inclusion and may also be replaced by bovine serum albumin (BSA) in the Majority of laboratories. (IVP) of bovine embryos aims to maximize the use of female CCOs, which can generate up to 311 pregnancies from a single female. The new TIFOI technique is promising, when it comes to reducing PIVE costs, using the animal itself as a laboratory. As well as research on the molecular mechanisms during early embryonic development, and as interactions of culture media, are necessary, to maximize a quantity of blastocyst as a quality improving the viability of the technique.

Keywords: OPU-FIV, follicular aspiration. , maturation, fertilization, culture.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS	IX
1 INTRODUÇÃO	10
2 MATERIAL E MÉTODOS	12
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
3.1 ASPECTOS GERAIS DA produção in vitro de embriões (PIVE)	12
3.2 Aspiração folicular (OPU; <i>ovum pick up</i>)	13
3.3 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> (MIV)	15
3.3.1 Papel do complexo cumulus-oócito (CCO)	16
3.3.2 Meios de Maturação de CCOs	19
3.4 FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV)	22
3.4.1 Efeito do Espermatozoide	23
3.4.2 Meios de FIV	24
3.5 CULTIVO <i>IN VITRO</i> (CIV)	25
3.5.1 Fatores que influenciam no sucesso da CIV	26
3.5.2 Meios de CIV	27
4 IMPACTO DA PIVE NA PRODUÇÃO ANIMAL	28
4.1 ENTRAVES DA PIVE	30
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
6 REFERÊNCIAS	33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Imagem de intensidade máxima de microscopia confocal mostrando a projeção transzonal. Numerosos microfilamentos de actina em projeções estão em vermelho. Núcleos das células do cumulus estão corados em azul. 17
- Figura 2: Oócitos de bovinos imaturos, logo após a aspiração dos folículos ovarianos, apresentando células do *cumulus* compactas. 18
- Figura 3: Placa de petri com gotas de meio MIV cobertas com óleo mineral. 20
- Figura 4: Oócitos de bovinos maturados por 22 horas, apresentando expansão das células do cumulus. 22

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina sérica bovina
BSP1	Proteínas ligadoras de espermatozoide
CCO	Complexo <i>cumulus-oócito</i>
CIV	Cultivo <i>in vitro</i> de embriões
FERT-TALP	Tyrode-albumina-lactato-piruvato
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
LOS	Large offspring syndrome
MIV	Maturação <i>in vitro</i> de embriões
OPU	<i>Ovum pick up</i>
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
SFB	Soro fetal bovino
SIBC	Sistema de Incubação de Baixo Custo
SIC	Sistema de Incubação Convencional
SOF	Fluido sintético do oviduto
SOV-TE	Transferência de embriões por superovulação
TCM 199	Tissue Culture Medium 199
TE	Transferência de embriões
TIFOI	Transferência intra-folicular de oócitos imaturos

1 INTRODUÇÃO

As inovações tecnológicas em reprodução animal têm avançando de forma rápida e evidente. A primeira transferência de embriões (TE) foi realizada na década de 70, e resultou no nascimento do primeiro bezerro produzido por meio de duas etapas seguidas da produção *in vitro* de embriões (PIVE) (maturação e fertilização *in vitro*), que ocorreu no Japão no ano de 1977, em condições totalmente inviáveis para se aplicar na produção animal (IRITANI e NIWA, 1977).

Em 1976 foi criada a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), com a qual se iniciou também a divulgação de relatórios anuais que permitiram maiores informações e acesso a inovações tecnológicas, utilizadas em outros países, o que propiciou grande difusão da TE no mundo. (RODRIGUES, 2010).

No Brasil, a primeira tentativa de TE ocorreu em 1977 com vinda do professor Dr. Joachim Hahn, através do convênio entre a Universidade de Santa Maria e a Escola superior de Medicina Veterinária de Hannover/Alemanha. Porém, somente em 1979, nasceu o primeiro bezerro, em Sorocaba no Estado de São Paulo e, logo após, em 1985, foi criada a SBTE (Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões) e o primeiro congresso ocorreu em 1986 (RUBIN, 2005). Os primeiros bezerros produzidos inteiramente por MIV-FIV-CIV nasceram em 1987 (FUKUDA et al., 1990). Em menos de 10 anos com auxílio de pesquisas já era possível produzir e implantar embriões viáveis sem a necessidade de técnicas cirúrgicas.

Com o advento da TE, a PIVE (produção *in vitro* de embriões), foi impulsionada pela necessidade de se produzir embriões provenientes de fêmeas com mérito genético, porém impossibilitadas de desenvolver estes embriões *in vivo*. Após o nascimento do primeiro bebê

humano de proveta, Louise Brown em 1978, na Inglaterra, houve então uma expansão na PIVE em diferentes espécies animais (STEPTOE e EDWARDS, 1978).

O interesse crescente da PIVE decorreu da possibilidade de otimizar a utilização de gametas de uma fêmea, visto que o número de produtos obtidos supera o de transferência de embriões por superovulação (SOV-TE), aprimoramento das condições de cultivo *in vitro*, bem como das técnicas de recuperação de oócitos *in vivo* tornaram-se viáveis à aplicação da PIVE em escala comercial desde a década de 90 (RUMPF et al., 2000).

A relativa baixa eficiência da técnica e também a menor qualidade dos embriões produzidos *in vitro*, quando comparados com os produzidos *in vivo*, são outros fatores limitantes, uma vez que aproximadamente de 30% a 40% dos oócitos colocados para maturar se desenvolvem até o estágio de blastocisto (KASSENS et al., 2015) e mesmo utilizando as melhores técnicas na coleta, não ultrapassam de 50% a taxa de blastocisto (GILBERT et al., 2015). Dessa forma, vários estudos foram e continuam sendo realizados com o objetivo de incrementar as etapas desta biotécnica visando à sua máxima eficiência.

Atualmente, com as inovações tecnológicas da PIVE, foi possível alcançar novas descobertas. Kassens et al. (2015) descreveram a obtenção do primeiro bezerro nascido por meio da transferência intrafolicular de oócitos (TIFO) maturados *in vitro*. No Brasil, Spricigo et al. (2016) obtiveram blastocistos viáveis e gestações produzidas após transferência intrafolicular de oócitos imaturos (TIFOI) de bovinos.

A presente revisão tem como objetivo realizar um levantamento de atualizações de todas as etapas de PIVE, a fim de possibilitar a exploração de informações das melhores técnicas empregadas, levando em consideração estudos realizados recentemente para melhorar as etapas da PIVE.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma revisão bibliográfica, detalhando o estado da arte da PIVE no Brasil e no mundo, enfatizando as tecnologias hoje utilizadas, para aumentar a eficiência da técnica, e evidenciando as dificuldades e limitações da produção de embriões de qualidade.

Nesta pesquisa foi utilizada como fonte de informações material científico publicado sobre o tema. As etapas seguidas na revisão foram a identificação bibliográfica preliminar, análise e interpretação do material, e elaboração do relatório final.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ASPECTOS GERAIS DA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES (PIVE)

Diversos fatores influenciam no sucesso da PIVE, além de manterem todo o ambiente favorável à produção *in vitro*, outros fatores como a qualidade do espermatozoide, a qualidade do oócito, o momento da fertilização, o meio de maturação e o tipo de cultivo, influenciam de forma significativa na eficiência e eficácia da biotécnica.

A qualidade oocitária afeta todas as etapas da PIVE, o que resulta na eficiência do cultivo, podendo ser boa ou ruim dependendo das condições em que a fêmea doadora se encontra no momento da OPU (BARBOSA et al., 2013). Os fatores relacionados à raça, estresse térmico e nutrição devem ser considerados antes da aplicação da OPU-PIVE (BARUSELLI et al., 2015). Por outro lado, estratégias estabelecidas para manipular a dinâmica folicular (sincronização da emergência da onda folicular e superestimulação) pode otimizar a eficiência das técnicas de produção de embriões (MAPLETOFT et al., 2015).

Alguns cuidados na coleta deve ser considerados, como a presença do corpo lúteo, onde Barbosa et al (2013), encontram maiores produção de embriões viáveis com oócitos provenientes do ovários com corpo lúteo, após o 7 dia de cultivo *in vitro*, quando comparado com os oócitos obtidos de ovário sem corpo lúteo.

Todas a etapas da PIVE são realizadas em estufa, preconizando sempre as condições mais próximas do ambiente uterino, realizado em temperatura de 39° C com atmosfera controlada (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) e umidade saturada (MELLO et al., 2016; AMINI, 2016).

3.2 ASPIRAÇÃO FOLICULAR (OPU; *ovum pick up*)

A aspiração folicular de oócitos (OPU) para a PIVE visa obter material biológico de animais com alto mérito genético (VEGA et al., 2015), podendo utilizar animais que apresentam afecções limitantes à reprodução, mas não aos gametas. Esta técnica visa maximizar a produção de animais da elite, possibilitando a disseminação de sua progênie de forma rápida.

A OPU foi desenvolvida pela primeira vez na década de 80, o que alavancou a PIVE no mundo, dispensando assim o método cirúrgico (VIANA e BOLS, 2005). A técnica consiste na coleta de complexo do *cúmulus-oócito* com o auxílio de ultrassom para guiar o procedimento de recuperação em animais vivos, através da punção folicular ovarina (STROEBECH et al., 2015). Em alguns casos, utiliza-se a estimulação hormonal para obter o máximo de folículos que forneçam quantidades significantes de oócitos para PIVE (BARUSELLI et al., 2015).

Vieira et al. (2014) desenvolveram uma técnica de superestimulação hormonal para maximizar a quantidade de CCOs recuperados, que utiliza protocolo de 7 dias com o uso

de FSH/LH aumentando a quantidade de folículos de tamanho médio, ideal para a OPU, além de melhorar as taxas de blastocistos e aumentar a produção de embriões.

A aspiração folicular de oócitos pode ser realizada de duas maneiras, post-mortem ou *in vivo*, onde a técnica empregada pode variar. A aspiração *in vivo* é realizada através da manipulação ovariana transretal, em doadoras vivas, com o auxílio da imagem ultrassonográfica (VEGA et al., 2015). Já na aspiração *post-mortem*, os folículos são puncionados de ovários provenientes de abatedouro e o oócito específico pode ser puncionado por meio de visualização direta do folículo, sem a necessidade do uso de técnicas sofisticadas (VIANA e BOLS, 2005; GILBERT et al., 2015).

As vacas estimuladas para a OPU são aspiradas apenas uma vez por semana, já as não estimuladas podem ser aspiradas duas vezes (ROOVER et al., 2007; WRENZYCKI; 2016). Uma única aspiração em animais estimulados pode ser melhor, uma vez que a quantidade de oócitos recuperados é igual a duas aspirações em vaca não estimuladas, reduzindo o estresse causado pela OPU.

Atualmente, uma nova técnica promissora é a avaliação da quantidade de hormônio anti-mülleriano (AMH) em bovinos, que está correlacionada com quantidade e qualidade de CCOs recuperados, podendo ser utilizado para selecionar animais com maior potencial para uso na PIVE, acelerando o processo de melhoramento genético, sendo considerado um marcador endócrino de reserva ovariana, uma vez que possibilita a avaliação de animais jovens antes do amadurecimento sexual (GUERREIRO et al., 2014, VERNUNFT et al., 2015, BARUSELLI et al., 2015).

O AMH é usado para avaliar o esgotamento ovariano da fêmea, observado através da redução de sua concentração no sangue (SILVA et al., 2016), podendo determinar o tempo em que a fêmea já não é mais apta a PIVE.

3.3 MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

A maturação *in vitro* (MIV) de oócitos é iniciada imediatamente após a remoção do oócito imaturo dos pequenos folículos antrais (WRENZYCKI, 2016), haja vista que os oócitos, inicialmente permanecem na fase de diplóteno, até serem removidos de suas células foliculares circundantes ou expostos ao pico pré-ovulatório de gonadotrofina. À medida que o oócito adquire competência meiótica, ele adquire a capacidade de ser liberado da fase de diplóteno, e progredir para metáfase II (MII), com diâmetro folicular em torno de 3mm (DICKINSON et al., 2016; STROEBECH et al., 2015).

A maturação completa ocorre naturalmente no período que antecede a ovulação, ou seja, no período pré-ovulatório do folículo, onde acontece a preparação para o momento da fertilização (DICKINSON et al., 2016). Quando se trata de PIVE, todos esses processos devem ocorrer em laboratório, para um maior controle e exatidão de cada etapa dessa tecnologia, com intuito de maximizar a produção e qualidade dos embriões produzidos.

A maturação possui duas fases, a nuclear (visualizada pela extrusão do segundo corpo polar) e citoplasmática (alterações bioquímicas e estruturais). A maturação deve alcançar a maturação completa para a fertilização e o desenvolvimento antes da implantação, onde dependem do crescimento e diferenciação adequados dos oócitos imaturos e das células *cumulus* circundantes (MALEKI et al., 2016). As condições de cultura *in vitro* devem se manter próximas as condições *in vivo*, onde se deve ter rigor no controle tensão de oxigênio para não causar estresse oxidativo, uma vez que no oviduto o teor de oxigênio é baixo (KASTERSTEIN et al., 2013).

A expansão da células do *cúmulus* é essencial para a maturação de oócitos e a liberação através da ovulação para uma fertilização bem sucedida, pois marca um momento

importante na maturação (GEBREMEDHN et al., 2016). A expansão ocorre devido reações de interação entre o CCOs, onde normalmente após esse marco é removida para a realização da fertilização (MENCHACA et al., 2016).

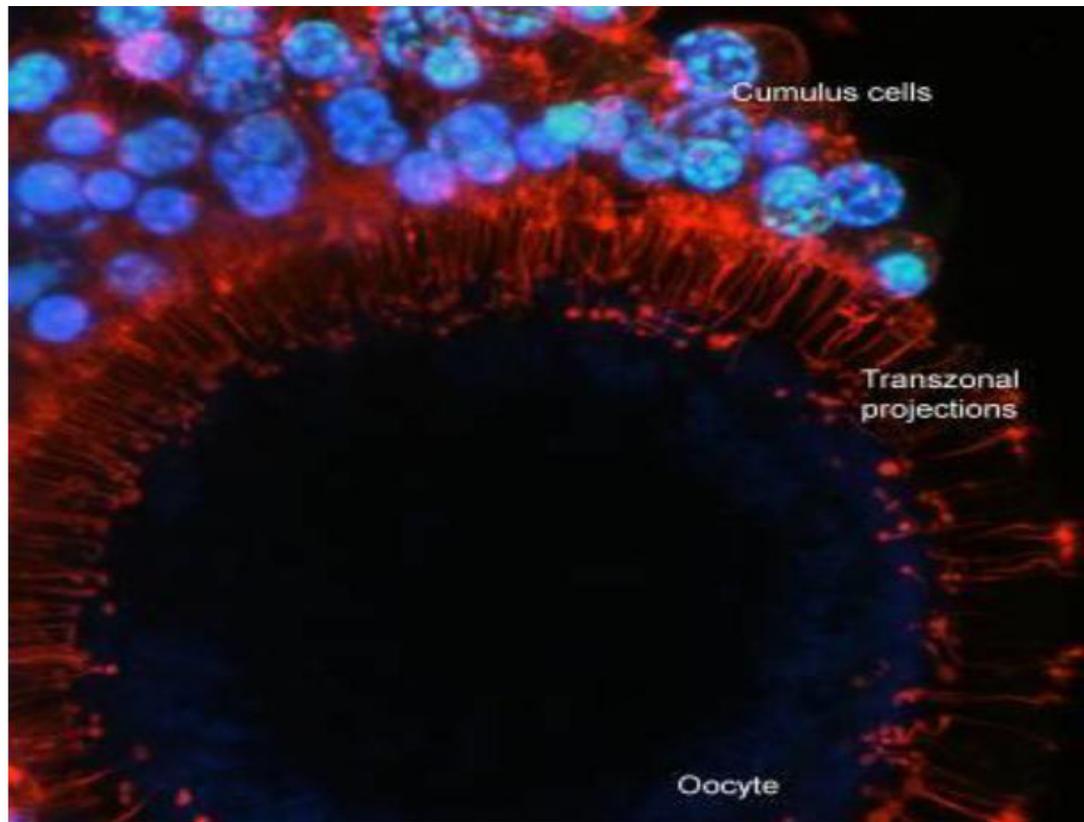
A maturação define o sucesso de todo o processo, pois a maturação inadequada, seja do núcleo ou do citoplasma, inviabiliza todas as etapas da PIVE, reduz a taxa de fecundação e aumenta a ocorrência de polispermia e bloqueio do desenvolvimento embrionário (VARAGO et al., 2008).

3.3.1 *Papel do complexo cumulus-oócito (CCO)*

O complexo *cumulus-oócito* (CCOs) é um sistema em que se organizam as células juntamente com o oócito, gerando um complexo tridimensional que dá sustentação e nutrição ao oócito, sendo de grande importância durante o seu crescimento e desenvolvimento, e durante a maturação e fertilização (SUTTON-MCDOWALL e THOMPSON, 2015; BORUSZEWSKA et al., 2015).

As células do complexo *cumulus-oócito* são células da granulosa, intimamente associadas entre si com o oócito, por meio de uma rede extensiva de canais transmembranares conhecida como gap junctions , responsável por desempenhar um papel de nutrição do oócito (figura 01), através de nutrientes e substratos (GILBERT et al.,2015; MELO,2010; APPELTANT et al., 2016).

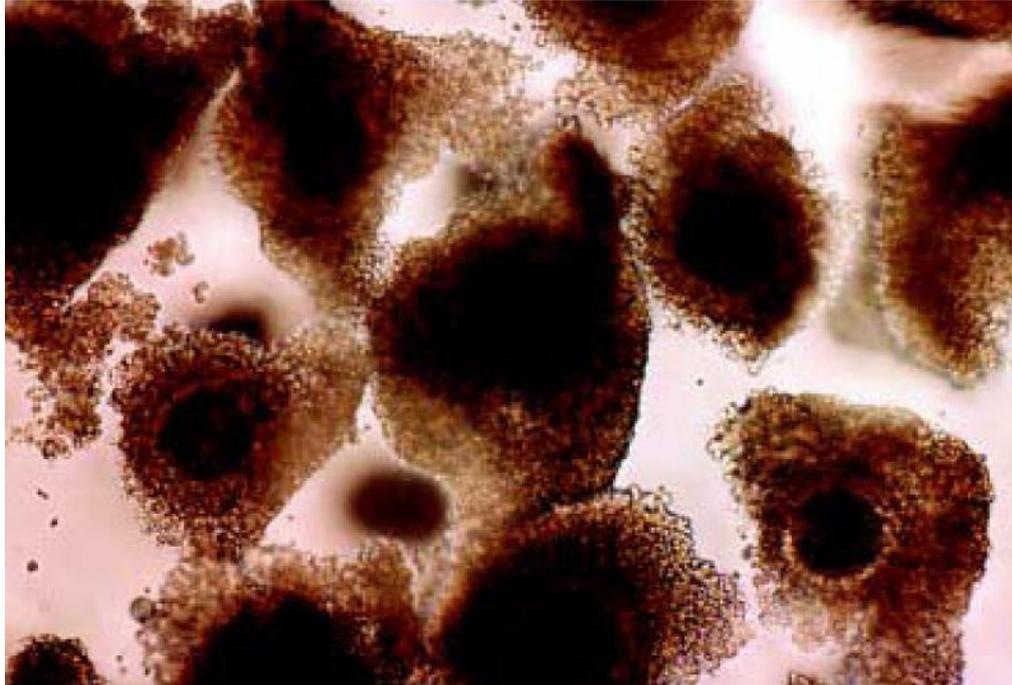
Figura 1: Imagem de intensidade máxima de microscopia confocal mostrando a projeção transzonal. Numerosos microfilamentos de actina em projeções estão em vermelho. Núcleos das células do cumulus estão corados em azul.



Fonte: GILBERT et al. (2015)

O CCOs contêm dois tipos de células distintas, com diferentes perfis metabólicos, como demonstra a figura 02: *i*) o oócito, que é o gameta e sofre progressiva e predominantemente fosforilação oxidativa; *ii*) o *cumulus*, que são células da granulosa unidas por junções gap ao oócito que tem elevada taxa de atividade glicolítica (SUTTON-MCDOWALL e THOMPSON, 2015).

Figura 2: Oócitos de bovinos imaturos, logo após a aspiração dos folículos ovarianos, apresentando células do *cumulus* compactas.



Fonte: **DODE (2002)**

Em um estudo realizado por Gottardi et al. (2012) foi demonstrado que a ausência de células do *cumulus* durante o cultivo de oócitos bovinos, prejudica a maturação nuclear, sendo que a suplementação de cisteamina no meio de MIV restaura a capacidade de progressão da meiose em oócitos desnudos. Segundo Gebremedhn et al, (2016) o acoplamento metabólico entre oócitos e células do *cumulus* durante a MIV é essencial para obtenção da competência do oócito para suportar o desenvolvimento embrionário inicial.

Existem evidências de que fatores secretados pelas células do *cumulus* são também importantes para a promoção da maturação citoplasmática do oócito e a aquisição da competência para o desenvolvimento embrionário, sendo que esses parâmetros podem ser avaliados pela determinação da taxa de desenvolvimento embrionário após a fecundação (SUTTON-MCDOWALL et al., 2015).

Após a coleta, os oócitos são classificados em diferentes graus, de acordo com a presença das células do cumulus e características do ooplasma, sendo grau I oócito contornado com três ou mais camadas de células do cumulus; grau II oócito contornado com uma a duas camadas de células do cumulus; grau III oócito desnudo e grau IV oócito degenerado (VIANA, 2004), sendo indicados para a PIVE os de grau I e II, considerado como excelente e bom (ANDRADE et al., 2012).

3.3.2 Meios de Maturação de CCOs

A MIV é iniciada após a remoção do oócito imaturo dos folículos antrais por OPU, o sistema produção *in vitro* idealiza sempre que oócitos isolados atinjam o crescimento e a competência para maturação em um meio definido sem a unidade folicular (WRENZYCKI, 2016). A temperatura de exposição dos oócito deve ser controlada pois quando expostos a altas temperaturas a arquitetura do citoesqueleto é danificada reduzindo a maturação nuclear oocitária e induzindo a morte por apoptose. A temperatura ideal de maturação é de 39°C com atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ (MENCHACA et al., 2016; VEGA et al., 2015).

Os oócitos quando cultivados devem permanecer com as junções *gap* intactas entre o oócito e as células do *cumulus*, pois estas células metabolizam os nutrientes e transferem via junções *gap* para o oócito servindo como fonte de energia, proporcionando crescimento e tornando-se competentes para serem submetidas à maturação nuclear (MATZUK et al., 2002.; LOPES, 2010).

A morfologia e o grau de expansão das células do cumulus são utilizados normalmente para avaliação da maturação oocitária, onde a expansão, o enegrecimento do cumulus, e citoplasma mais heterogêneo são características utilizadas para se verificar a maturação oocitária e estão relacionados com a qualidade embrionária (CHAVES et al., 2010). Uma

outra característica para avaliar a maturação é a presença de cromossomos bem condensados, com corpúsculo polar evidente (SUN et al., 2004).

Na maturação *in vitro* é comum utilizar meio coberto por óleo de parafina ou óleo mineral para evitar a evaporação como mostra a figura 03 (CHAVES, 2010; MENCHACA, 2016; BORUSZEWSKA et al., 2015) .

Figura 3: Placa de petri com gotas de meio MIV cobertas com óleo mineral.



Fonte: **SENEDA (2006)**

O fluido folicular tem sido utilizado com eficiência nos meios de maturação, pois consiste em uma mistura complexa de ácidos nucleicos, proteínas, metabólitos, hormônios, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, e íons, que são conhecidos por serem segregados pelos oócitos, células granulosas, células da teca e componentes do plasma sanguíneo que vêm ao fluido folicular pelos capilares da teca, proporcionando um ambiente

adequado para a maturação dos oócitos (GEBREMEDHN, 2016). Agem na expansão do CCOs, na maturação nuclear e na fecundação, através da atividade de eliminação de radicais, a partir de isoenzimas, o que melhora os resultados na maturação citoplasmática, responsável pela competência no desenvolvimento pós-fertilização, protegendo o oócito do estresse oxidativo (CHAVES, 2010).

Um meio bastante utilizado é o meio Tissue Culture Medium 199 (TCM199) (VEGA et al., 2015). O TCM199 é modificado de acordo com cada laboratório, contém vitaminas, cisteína e ácido ascórbico protegendo a célula do estresse oxidativo, onde é suplementado com outros componentes piruvato, lactato, aminoácidos, bicarbonato de sódio, vitaminas, entre outras substâncias geralmente nas concentrações encontradas no soro sanguíneo (MENCHACA, 2016; AMINI et al., 2016; VARAGO et al., 2008). Este meio também pode ser suplementado com gonadotrofinas (MENCHACA et al., 2016).

A maturação pode durar de 18 a 24 horas, gerando 90% dos oócitos na fase M II (CHAVES et al., 2010; VERNUNFT et al., 2015). O momento certo que define a maturação é uma característica que dá pra se observar visualmente através da expansão das células do *cumulus*, observado na figura 04, que marca o momento no qual o oócito atingiu as características adequadas pra a fertilização (AMINI et al., 2016). Os oócitos ao atingirem a maturação são desnudados por pipetagem (AMINI et al., 2016; ROOVER et al., 2007).

Figura 4: Oócitos de bovinos maturados por 22 horas, apresentando expansão das células do cumulus.



Fonte: (DODE et al., 2002)

3.4 FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

A fecundação se refere ao processo em que o espermatozoide entra em contato com o oócito, gerando o zigoto, que, posteriormente, se desenvolve até o estágio de blastocisto (MELO et al., 2016). A fecundação desencadeia um complexo programa celular, transformando duas células germinativas meióticas, em um embrião totipotente (PEÑA, 2015).

A fertilização do oócito *in vitro* pode ocorrer de duas formas, a tradicional, mais utilizada, que consiste em capacitar o espermatozoide *in vitro* e posterior fecundação em meio quimicamente definido, onde os espermatozoides alcançam e fecundam o oócito; e a injeção intracitoplasmática do espermatozoide utilizada para tratar a infertilidade masculina, que consiste na injeção da célula espermática no oócito maduro (KATO e NAGAO, 2015), que pode se aplicar na PIVE de bovinos em casos específicos, como problemas reprodutivos adquiridos em machos.

3.4.1 *Efeito do Espermatozoide*

Existe grande variação com relação à taxa de produção embrionária no sistema de FIV, sendo o sêmen e a indução da capacitação espermática, fatores que contribuem para o sucesso na FIV.

A capacitação é um processo complexo que ocorre normalmente no oviduto, e envolve alterações bioquímicas e morfológicas para permitir que o espermatozoide competente chegue ao oócito e se ligue à zona pelúcida (FLAHERTY, 2015; ICKOWICZ et al., 2012). Para a capacitação é necessário que ocorra a seleção e recuperação de espermatozoides móveis para a fecundação *in vitro*, separando os espermatozoides vivos dos mortos e do plasma seminal e/ou do diluente usado para a congelação, obtendo-se um meio livre de contaminantes (HENKEL e SCHILL, 2003).

Para isto, são utilizados vários métodos de eliminação do plasma seminal e separação da fração móvel do sêmen diluído e descongelado, sendo o método mais comum para a preparação de espermatozoides o gradiente de Percoll ou o swim-up (WRENZYCKI, 2016.; FONSECA, 2010;). A seleção espermática realizada pela técnica de gradiente de Percoll é caracterizada pela centrifugação através de um gradiente de concentração, como uma mistura de Percoll 45% sobre uma solução de 90% (WRENZYCKI, 2016.; SILVA et al., 2009). O swim-up consiste na migração ascendente das células móveis em uma solução, de forma natural (ZÚCCARI, 2008). O método Percoll apresenta melhores resultados quando comparado com swim-up, devido ao maior número de espermatozoides recuperados e maior motilidade espermática (PARRISH, 2014).

O uso de espermatozóides sexados tem sido bastante utilizado, pois de acordo com a espécie animal e a finalidade comercial da produção animal, possibilita a escolha do

sexo do embrião a ser implantado, maximizando a produção de leite e carne (ARRUDA et al., 2012; PELLEGRINO et al., 2016). A sexagem afeta algumas características estruturais do espermatozoide bovino, pois promove alterações na funcionalidade da membrana e na motilidade, embora não elimina a sua capacidade de gerar embriões *in vitro*.

Loiola et al.(2014) utilizaram dois grupos diferentes para a fertilização *in vitro*, o primeiro com sêmen convencional e o segundo com sêmen sexado de bovino. Neste trabalho não foram encontradas diferenças no número de oócitos clivados e nem nas taxas de gestação, porém o sêmen sexado favoreceu um número maior de embriões produzidos. Já Mello et al. (2016) demonstraram que o sêmen não sexado apresenta melhores resultados com relação as taxas de clivagem e de blastocistos.

Os espermatozoides devem sofrer alterações bioquímicas que lhes permita realizar a reação do acrosoma durante a exposição à zona pelúcida, se tornando capaz de fecundar o oócito (PARRICH, 2014). Os espermatozoides congelados são usados na maioria dos casos, embora apresentem redução na fertilidade em comparação com a dose recém-ejaculada (D'AMOURS et al., 2012), portanto o método a ser utilizado na sua capacitação deve apresentar espermatozoides com maior motilidade, uma vez que sendo criopreservados apresentam uma quantidade considerável de células mortas.

3.4.2 Meios de FIV

Em condições fisiológicas os espermatozoides necessitam chegar à ampola do oviduto para fecundar o oócito (MELO et al., 2016). Durante esse percurso e, principalmente no ístmo, glicosaminoglicanos induzem a capacitação dos espermatozoides, tornando possível a ligação do espermatozoide à zona pelúcida (GONÇALVES, 2007). Isto também é necessário na fertilização *in vitro*, para que ocorra esse processo, os meios usados devem fornecer um ambiente adequado que favoreça a fertilização.

A capacitação espermática normalmente é alcançada com a adição de heparina ao meio de fertilização e durante a preparação do sêmen antes da FIV (MENCHACA, et al., 2016; WRENZYCKI, 2016). Atualmente estudos demonstram que o uso de proteínas BSP1 (proteínas ligadoras de espermatozoide) presentes no plasma seminal é tão eficiente quanto heparina para indução da capacitação espermática, e a capacidade de fertilização do espermatozoide (MOURA, 2016). O uso da heparina para capacitar espermatozoides foi um marco para a PIVE. A BSP1 apresentou efeito nocivo no desenvolvimento embrionário *in vitro*, devido ao tempo de exposição durante a fertilização (18h), sendo nocivos ao espermatozoide criopreservado (MOURA 2016).

O meio mais usado para fecundação *in vitro* é o FERT-TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato), que contém componentes necessários para promover a capacitação espermática, como a heparina, além de outros fatores importantes para a motilidade progressiva e suporte do gameta masculino (MELO et al., 2016). A heparina é um importante capacitador de espermatozoides (PARRISH, 2014). O meio ainda pode ser suplementado com penicilamina, hipotaurina e adrenalina (KASSENS et al.,2015; MENCHACA et al., 2016).

3.5 CULTIVO IN VITRO (CIV)

O cultivo de embriões bovinos é o último passo do processo da PIVE e envolve cerca de seis dias de cultura a partir do zigoto. Para se obter os melhores resultados se utiliza as condições mais próximas possíveis das encontradas nas condições *in vivo* (WRENZYCKI, 2016). O tempo de cultivo *in vitro* pode apresentar variação de 7 a 9 dias, durante este processo, a taxa de blastocisto geralmente é avaliada no 7º dia de cultivo, sendo que os blastocistos devem permanecer em condições adequadas para esta fase (WELLS, 2010).

O principal objetivo do cultivo é proporcionar condições adequadas através de meios com componentes que permitam o zigoto passar a transição materno-zigótica e desenvolver-se até o estágio de blastocisto (FONSECA et al., 2010).

Após a fertilização, o desenvolvimento do embrião caracteriza-se por uma série de eventos, tais como a ativação do genoma e as divisões mitóticas que dão origem ao blastocisto (ALMIÑANA, 2015; SILVA, 2012).

3.5.1 Fatores que influenciam no sucesso da CIV

Para se obter taxas satisfatórias de desenvolvimento embrionário é necessário se manter condições as mais próximas possíveis encontradas na tuba uterina, que é onde o oócito fecundado inicia o seu desenvolvimento, até chegar à fase de embrião (LIMA e SOUSA, 2009). O pH, oxigênio, hormônios e nutrientes devem estar presentes nas mesmas quantidades ou em quantidades próximas às do ambiente uterino (FIGUEIREDO, 2010.; WRENZYCKI, 2016).

Neonatos produzidos *in vitro* têm maiores chances de apresentar a síndrome do bezerro grande (large offspring syndrome - LOS), caracterizada pelo crescimento embrionário e fetal exagerado, padrões de expressão gênica alterados e elevadas perdas perinatais (WRENZYCKI, 2016; HERAS et al., 2016). Problemas particularmente relacionados a LOS foram resolvidos através da retirada de soro e melhoria dos meios para o cultivo de embriões (KADARMIDEEN et al., 2015), ou no uso de quantidades menores de soro no cultivo, onde o uso de até 5% de soro não é prejudicial, aumentando as taxas de blastocistos (TAVARES et al., 2008)

Uma das grandes diferenças entre o ambiente *in vivo* e o *in vitro* é a tensão de oxigênio, visto que a tensão de oxigênio no oviduto e no útero é menor do que a utilizada nos

sistemas de cultivo embrionário *in vitro*, tendo grande influência na produção e na qualidade dos embriões (CHAVES et al., 2010) Para minimizar esses efeitos do estresse oxidativo, utiliza-se a redução da tensão de O₂ nos sistemas de cultivo *in vitro*, redução do tempo de manipulação sob luz incandescente (estereomicroscópio), adição de antioxidantes ao meio de cultivo e realização de um co-cultivo com células somáticas (SILVA, 2010).

3.5.2 Meios de CIV

O sistema tradicional adotado pela maioria dos trabalhos de PIVE é realizado em estufa com atmosfera saturada, por até 8 dias (KASSENS et al., 2015). O cuidado com o teor de oxigênio, deve ser constante, devido a, em seu estágio inicial, o embrião ser muito sensível à oxidação, podendo causar danos no DNA ou redução no seu desenvolvimento (TAKAHASHI et al., 2016).

O cultivo é uma etapa importante, sendo marcado pelo início do desenvolvimento embrionário, onde ocorre a primeira divisão celular, alcançando o estágio de blastocisto ou blastocisto expandido, cultivados em meio semi-definido, com pouco ou nenhum soro (VARAGO et al., 2008).

Vajta et al. (1997) desenvolveram um sistema alternativo para cultivo de oócito/embrião que foi bastante difundido, que consiste no cultivo do oócito/embrião em bolsas plásticas, as quais, após a colocação da placa de cultivo em seu interior, são gaseificadas com uma mistura gasosa industrial contendo 5% de CO₂ e seladas, onde são colocadas em pequenas estantes e submersas em banho-maria a 38,7°C, este sistema foi denominado de “Sistema Submarino” para cultivo de embriões.

Assim como o sistema submarino, foram desenvolvidos vários outros tais como, incubadoras portáteis, Sistema de Incubação Convencional, Sistema de Incubação de Baixo

Custo, entre outros, visando a redução dos custos através do desenvolvimento de sistemas alternativos, avaliando novos meios de cultivo para oócitos e embriões (MIRANDA, 2007).

As fontes protéicas mais utilizadas em sistemas de cultivo *in vitro* são o soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA) (LONERGAN et al, 1999). Lonergan (2006) relataram o aumento da expressão de genes ligados ao estresse, em embriões cultivados com SFB.

Devido aos riscos que o uso do SFB apresenta para o cultivo, estudos continuam, para substituir o SFB por outras substancias que proporcionem os mesmo resultados com relação as taxas de blastocistos. Atualmente, tem sido utilizado soro sintético suplementado com albumina sérica bovina (BSA) (STROEBECH et al., 2015). Também é utilizado fluido sintético do oviduto (SOF) (AMINI et al., 2016; ROOVER et al., 2007; KASSENS et al., 2016). Estudos continuam sendo realizados para manter as concentrações dos nutrientes nas concentrações ideais, durante o cultivo *in vitro*.

4 IMPACTO DA PIVE NA PRODUÇÃO ANIMAL

A produção *in vitro* de embriões (PIV) tem sido bastante utilizada, para o melhor aproveitamento de animais com genética superior, uma vez que em condições fisiológicas, a fêmea tem a produção de até 10 bezerros durante sua vida produtiva (LOIOLA, 2014). Atualmente, por aspiração, em média, são recuperados 30 CCOs viáveis, chegando a 2.880 oócitos viáveis por ano, por animal, considerando as perdas na produção *in vitro*, 32,8% chegam a embriões e 33% desses embriões chegam à gestação, totalizando 944 embriões, e 311 gestações, possibilitando uma maior disseminação e aproveitamento de uma genética com mérito (LOIOLA, 2014; WRENZYCKI, 2016).

O crescimento do PIVE no Brasil é tão evidente que só América do Sul foi responsável por 72,7% da OPU-PIVE em bovinos (IETS, 2014). Mundialmente a TE-OPU teve um aumento de 16,7%, com relação ao ano de 2013. O Brasil em particular, produziu 70,8% dos embriões de FIV OPU no mundo no mesmo período (IETS, 2014). O Brasil expandiu mais de sete vezes a PIVE em bovinos entre 2001 (50.000 embriões) e 2013 (366.517 embriões) (KADARMIDEEN et al., 2015). Os índices atuais da PIVE refletem o potencial do mercado brasileiro em programas de OPU e PIVE em larga escala (OIKAWA et al., 2016).

Atualmente uma nova técnica tem sido estudada por pesquisadores que é a transferência intrafolicular de oócitos maturados *in vitro* descrito por Kassens et al. (2015), os quais avaliaram o desenvolvimento, tolerância à criopreservação, teor de lipídeos e viabilidade após a transferência, comparando o sistemas de transferência de oócito intrafolicular (Intrafollicular Oocyte Transfer; TIFO) com a produção *in vivo* e *in vitro* de embriões, apresentando resultados inferiores para TIFO com relação a taxa de clivagem, e valores iguais para taxa de gestação, enquanto as taxas de blastocisto foram maiores para TIFO, com relação a produção *in vitro*. Durante esse trabalho nasceram os primeiros bezerros provenientes da transferência intra folicular de oocitos na Alemanha.

A EMBRAPA recursos Genéticos e Biotecnologia do distrito Federal, lançou uma nova técnica que dispensa o uso de laboratório, facilitando a disseminação mais rápida de material genético de qualidade. Essa técnica é caracterizada pela Transferência intrafolicular de ovócitos imaturos (TIFOI). Os óvulos são aspirados da mesma maneira que na PIVE, mas em vez de maturados em laboratório, são cultivados dentro do próprio corpo da fêmea (ovuladora), aproveitando o seu processo reprodutivo natural. Após a ovulação, os óvulos são fecundados por inseminação artificial. Sete dias depois, os embriões que se desenvolveram

são coletados e transferidos para a vaca receptora semelhante ao que ocorre na transferência clássica de embriões (SPRÍCIGO et al., 2016).

4.1 ENTRAVES E PERSPECTIVAS DA PIVE

A produção *in vitro* de embriões, mesmo sendo uma técnica inovadora, ainda apresenta fatores limitantes, dentre eles, destaca-se a distância do laboratório para a fazenda. Para solucionar o problema, Loiola et al. (2014) avaliaram um programa de PIVE com transporte por longas distâncias em que parte do cultivo ocorreu no transporte. No estudo, foi utilizado um sistema portátil de incubação, em que a maturação completa aconteceu durante o transporte, iniciada imediatamente após a coleta e finalizada no momento em que chegava no local da transferência, obtendo assim resultados satisfatório nas taxa de produção de embrião e de gestação.

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

As perdas embrionária na fase pré-implantacional são comuns, onde apenas 50% dos embriões transferidos geram gestação até o estágio final (MENCHACA et al., 2016). Essas taxas são de origens diversas e podem ocorrer devido a problemas inerentes ao próprio embrião ou ao ambiente uterino. No entanto, acredita-se que a principal causa de mortalidade embrionária esteja relacionada à ocorrência de problemas de sinalização concepto-maternal, o que poderia favorecer o desenvolvimento assincrônico do embrião (LIMA e SOUZA, 2009).

As perdas embrionárias ocorrem no primeiro terço de gestação, onde com o decorrer dos dias, as taxas vão se reduzindo, até que no terceiro mês atingem 2%, (LONERGAN et al., 2016).

A eficiência da OPU está relacionada a aspectos técnicos que correspondem ao tipo e frequência do transdutor, à agulha utilizada na punção e à pressão de vácuo, e aos biológicos que compreendem a fase reprodutiva em que o animal se encontra, as terapias hormonais, (GONSALVES et al., 2002), o tamanho dos folículos (CASTILHO et al., 2007) além da raça dos animais.

A técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom promove no mínimo, uma lesão do tecido vaginal e ovariano, e nem sempre essa regeneração tecidual é satisfatória, sendo responsável pelo surgimento de algumas patologias descritas por Dória et al, (2008) como o surgimento de peritonite, ausência de sinais de parto, morte fetal, lesão de órgãos genitais, granuloma, lipoma na parede da vagina e aderência de ovários. Demonstrando que mesmo sendo uma técnica inovadora menos agressiva, causa danos ao animal, só que em pequena proporção.

Os problemas encontrados na PIVE, como a baixa taxa de blastocisto, baixa eficiência na produção de embriões, baixas taxas de gestação, momento fisiológico em que a receptora se encontra, ainda precisam ser aprimorados para que o ambiente *in vitro* se torne o mais próximo possível do ambiente *in vivo*, maximizando, assim, a produção de embriões e reduzindo os custos do embrião a ser implantado.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, o desenvolvimento da PIVE vem sendo pautado por muitas atualizações. Avanços nas técnicas e meios laboratoriais tem se tornado importantes, uma vez que o custo da PIVE está atrelado à taxa de produção de embriões com relação aos CCOs recuperados, tornando importante a busca por meios utilizados que apresentem melhores resultados, visando sempre atingir a mesma eficiência da produção *in vivo*.

A contribuição de trabalho de pesquisa durante muitos anos, e os resultados alcançados, tendo enfoque nesta revisão, fizeram da PIVE uma ferramenta de suporte para animais de produção, embora ainda existam algumas limitações que precisam ser estudadas e aprimoradas, para melhorar os resultados dessa técnica.

A qualidade dos embriões produzidos ainda é inferior em comparação aos embriões produzidos *in vivo*. Isso sugere que ainda há melhorias a serem feitas para aumentar a competência de desenvolvimento de oócitos e embriões. Portanto mais pesquisas estudos sobre os mecanismos moleculares durante o desenvolvimento embrionário inicial e as interações de meios de cultura, são necessárias para maximizar a quantidade e qualidade dos blastocistos, aumentando a viabilidade da técnica.

6 REFERÊNCIAS

- 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.
- ALMIÑANA, C. Espionando uma conversa privada entre a tuba uterina e gametas/embriões. **Anais**, 29., 2015, Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Gramado-RS, 2015, p.43-51.
- AMINI, E. D. V. M.; ASADPOURP, R; ROSHANGARP, 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, 2016.
- ANDRADE, G. A; FERNANDES, M. A; KNYCHALA, R. M; PEREIRA JUNIOR, M. V; OLIVEIRA, A. J; NUNES, D. P; BONATO, G. L; SANTOS, R. M. Factors affecting pregnancy rate of recipients of bovine embryos produced *in vitro*. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.36, n.1, p.66-69, 2012.
- APPELTANT, R; SOMFAI, T; MAES, D; VAN SOOM, A; K. Porcine oocyte maturation *in vitro*: role of cAMP and oocyte-secreted factors – A practical approach. **J. Reprod Dev.** v.62, p. 439–449, 2016.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C., ALONSO, M. A., CARVALHO, H. F. LEMES, K. M. SILVA, D. F. RODRIGUEZ, S. A. F. AFFONSO, F. J. Aspectos relacionados com a técnica e a utilização do sêmen sexado *in vitro* e *in vivo*. **Anais**, 26., 2012, Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu-PR, 2012, p.237-245.
- BARBOSA, C. P; TONIOLLO, G. H; GUIMARÃES, E. C. Produção *in vitro* de embriões de bovinos da raça nelore oriundos de ovócitos de ovários com e sem corpo lúteo. **Ci. Anim. Bras**,v.14, p. 81-90,2013.
- 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 vivo* e *in vitro* de embrião bovino Atualizações sobre estratégias de produção de embriões. **Anais**. 29, 2015., Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Gramado-RS, 2015, p. 52-60.
- BORUSZEWSKA, D; SINDEREWICZ, E; KOWALCZYK-ZIEBA, I; GRYCMACHER, K; WOCLAWEK-POTOCKA, I. The effect of lysophosphatidic acid during in vitro maturation of bovine cumulus–oocyte complexes: cumulus expansion, glucose metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade, oocyte and blastocyst competence. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v.13, p 1-18, 2015.
- 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. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, p.37-49, 2010.

D'AMOURS, O.; BORDELEAU, L. J.; FRENETTE, G.; BLONDIN, P.; LECLERC, P.; SULLIVAN, R. Binder of sperm 1 and epididymal sperm binding protein 1 are associated with different bull sperm subpopulations. *Reproduction*. v.143, p.759-771, 2012.

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 oocitária e do ambiente materno, *Anais*. 30, 2016., Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, 2016, p. 107-114.

DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C.; UENO, V. G.; FERNANDES, C. E. The effect of sperm preparation and time of co-incubation on in vitro fertilization of *Bos indicus* oocytes. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 69, n.1-2, p. 15-23, 2002.

DÓRIA, R. G S; CANOLA, P. A; CARDILLI, D. J; TONIOLLO, G. H; LEITE, F. G; ESPER, C. R; CANOLA, J. C. Complicações clínicas em vacas nelore doadoras de oócitos decorrentes da aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-som. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, p. 706-810, 2008

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; FAUSTINO, L. R. & RODRIGUES, A. P. R. Avanços no ovário artificial em caprinos. *Anais*. 24, 2010., Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 24., 2010. Porto de Galinhas, 2010, p. 133-139.

FLAHERTY, C. O. Redox regulation of mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl*. V, 17, p. 583-590. 2015.

FONSECA, J. F.; SOUZA, J. M. G.; CAMARGO, L. S. A. Produção de oócitos e embriões de pequenos ruminantes: passado, presente e futuro. *Anais*. 24, 2010., Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2010, p. 85-96.

FUKUDA Y, ICHIKAWA M, NAITO K, TOYODA Y. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells *in vitro* up to the blastocyst stage. *Biol Reprod*. v.42, n.114-9, 1990.

GEBREMEDHN, S.; PANDEY, H. O.; SALILEW-WONDIM, D.; HOELKER, M.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Dinâmica e papel dos microRNAs durante o desenvolvimento folicular em mamíferos. *Anais*. 30, 2016., Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, 2016, p. 140-147.

GILBERT, I; MACAULAY, A; ROBERT, C. Competência no desenvolvimento oocitário e qualidade embrionária: melhorias e novas perspectivas. *Anais*. 29, 2015., Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Gramado-RS, 2015, p.76-87.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, p.212-217, 2007.

GOTTARDI, F.P.; BARRETTO, L.S.S.; GONÇALVES, F.S.; PERRIL, S.H.V.; MIGOTI, G.Z. Efeito das células do *cumulus* e cisteamina durante o cultivo de maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência para desenvolvimento embrionário. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.2, p.245-252, 2012.

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 cumulus-oocyte complexes on pregnancy rates in a commercial 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.

HENKEL, R. R; SCHILL, W. B. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v.1, p.1-22, 2003.

HERAS, S; CONINCK, D. I. M; POUCKE, M. V; GOOSSENS, K; PASCOTTINI, O. B; NIEUWERBURGH, F. V; DEFORCE, D; SUTTER, P; LEROY, J. L. M. R; GUTIERREZ-ADAN, A; PEELMAN, L; SOOM, A. V. Suboptimal culture conditions induce more deviations in gene expression in male than female bovine blastocysts. **BMC Genomics**. V.17, p -15. 2016

ICKOWICZ, D; FINKELSTEIN, M; BREITBART, H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. **Asian J Androl**. v.14; p.816–821,2012.

IETS. International embryo transfer society. Statistics and data retrieval committee report. Embryo Transfer Newsletter . 2014.

IRITANI A, NIWA K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. **J Reprod Fertil**, v.50, p.119-121, 1977.

KADARMIDEEN, H. N; MAZZONI, G; WATANABE, Y. F; STRØBECH, L; BARUSELLI, P. S; MEIRELLES, F. V; CALLESEN, H; HYTTEL, P; FERRAZ, J. B. S; NOGUEIRA, 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**. 29, 2015., Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Gramado-RS, 2015, p. 67-75.

KASSENS, A; HELD, A; SALILEW-WONDIM, D; SIEME, H; WRENZYCKI, C; TESFAYE, D; SCHELLANDER, K; HOELKER, M. Intrafollicular Oocyte Transfer (IFOT) of Abattoir-Derived and In Vitro-Matured Oocytes Results in Viable Blastocysts and Birth of Healthy Calves. **Biology of reproduction**. V,92. P 1–14 2015.

KASTERSTEIN, E;STRASSBURGER, D; KOMAROVSKY, D; BERN, O; KOMSKY, A; RAZIEL, A; FRIEDLER, S; RON-EL, R. The effect of two distinct levels of oxygen concentration on embryo development in a sibling oocyte study. **J Assist Reprod Genet**. v 30, p 1073–1079. 2013.

KATO, Y; NAGAO, Y. Changes in Sperm Motility and Capacitation Induce Chromosomal Aberration of the Bovine Embryo following Intracytoplasmic Sperm Injection. **plos one**, v.10,p17,2015.

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.

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

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A. C. Effect of culture on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 137-152, 2006.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F.; RIEGER, D.; HUMBLOT, 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.

LOPES, M. D. Tecnologia reprodutiva em carnívoros domésticos. **Anais**. 24, 2010., Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. 2010, p. 105-109.

MALEKI, E. M; EIMANI, H; BIGDELI, M. R; NARENJI, A. G; M.SC, ABEDI, R. Effects of Crocin Supplementation during *In Vitro* Maturation of Mouse Oocytes on Glutathione Synthesis and Cytoplasmic Maturation. **Int J Fertil Steril**. v 10, p 53–61. 2016.

MAPLETOFT, R. J.; GARCÍA GUERRA, A.; DIAS, F. C. F.; SINGH, J.; ADAMS, G. P. Produção *in vivo* e *in vitro* de embriões em doadoras bovinas superestimuladas com FSH por 7 dias. **Anais**. 29, 2015. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Gramado-RS, 2015, p. 61-66.

MATZUK, M. M. BURNS, K. H. Viveiros MM, Eppig JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conservation. **Science**, v.296, p.2178-2190, 2002

MAZIERO R, GUAITOLINI C, PASCHOAL DM, KIEVITSBOSCH T, GUASTALI MD, MORAES CN, LANDIM-ALVARENGA FC. 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

MELLO, 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, v.40, n.2, p.58-64, 2016.

MELLO, R. R. C.; MELLO, M. R. B.; SOUSA, S. L. G.; FERREIRA, J. E. Parâmetros da produção *in vitro* de embriões da raça Sindi. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.51, n.10, p.1773-1779. 2016.

MELO, D.M. Tecnologia reprodutiva em carnívoros domésticos, **Anais**. 24, 2010., Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. 2010, p 105-111.

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.**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.218-223, 2007.

MOURA, A. A.; MEMILI, E. Aspectos funcionais do plasma seminal e proteínas espermáticas e seu potencial como marcadores moleculares da fertilidade . **Anais**. 30, 2016.,

Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu. 2016, p. 88-96.

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. **of Reproduction and Development**, v. 62, n. 11-16, 2016.

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

PELLEGRINO, C. A; MOROTTI, F; UNTURA, R. M; PONTES, J. H; PELLEGRINO, M. F; CAMPOLINA, J. P; SENEDA, M. M; BARBOSA, F. A; HENRY, M. Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of in vitro-produced embryos in cattle. **Theriogenology**. v. 86, p. 888-93, 2016.

PEÑA; F. J. Novos aspectos da fisiologia espermática e interações entre espermatozóides e oócitos. **Anais**, 29, 2015., Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Gramado-RS, 2015, p. 36-42.

PIETERSE, M.C.; KAPPEN, K.A. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v. 30, p.751-762, 1988.

RODRIGUES, B. A; MARQUES, L. S.; RODRIGUES, J.L.; Perspectiva Histórica da SBTE no Contexto das Biotécnicas de Reprodução. **Anais**. 24, 2010., XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. 2010, p 161-169.

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 .1439-0531, 2007.

RUBIN, M. I. B. Histórico dos 20 anos da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (1985-2005) *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 33, p. 35-54, 2005.

RUMPF, R.; DODE, M. A. N.; SILVA, A. E. D. F. Avanços na biotecnologia da reprodução dos bovinos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 3, 2000., Belo Horizonte: **Anais...** Soc. 2000

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*. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006., Londrina. **Anais...**Londrina, 2006, p. 172-180.

SILVA, C. M. G.; FAUTINO, L. R.; SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J.R. Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo *in vitro* de folículos e embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, n.4, p.233-242, 2010.

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, 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-Müllerian hormone (AMH) levels in antagonist ICSI cycles. **JBRA Assist. Reprod.**, v.20, p. 222-226, 2016.

SILVA, J. C. B; OKABE, W. K. TRALDI, A. S. Do bovino ao ovino: uma visão das dificuldades e sucessos da produção comercial de embriões *in vitro* de ovinos. **Anais**. 26, 2012., Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu-PR, 2012, p. 95-100.

SPRÍCIGO J. F. W; NETTO S. B. S; MUTERLLE, C. V; RODRIGUES S. A. D; LEME, L. O; GUIMARÃES A. L; CAIXETA, F. M. C; FRANCO, M. M; PIVATO, I; DODE M. A. N. Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes, **Theriogenology**, v.86, p. 2054-2062. 2016.

STEPTOE PC, EDWARDS RG. Birth after reimplantation of a human embryo. **Lancet**, v.2, p.366, 1978.

STROEBECH, L; MAZZONI, 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**, 29, 2015., Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Gramado-RS, 2015, p. 148-156.

SUN F, BETZENDAHL I, SHEN Y, CORTVRINDT R, SMITZ J, EICHENLAUB-RITTER U. Preantral follicle culture as a novel *in vitro* assay in reproductive toxicology testing in mammalian oocytes. **Mutagenesis**, v.19, p.13-25, 2004.

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

TAKAHASHI, T; SASAKI, K; SOMFAI, T; NAGAI, T; MANABE5, N; EDASHIGE, K.; N, N-Dimethylglycine decreases oxidative stress and improves *in vitro* development of bovine embryos. **J Reprod Dev**, v. 62, n.209-212, 2016.

TAVARES, L. M. T; FEITOSA, W. B; MELLO, M. R. B; NICÁCIO, A. C; LIMA, A. S; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A; VISINTIN, J. A. Is the early reduction of fetal calf serum concentration in bovine *in vitro* embryo culture beneficial?. **Anim. Reprod.**, v.5, p.34-38, 2008.

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The submarine incubation system, a new tool for *in vitro* embryo culture a tschnique report. **Theriogenology**, v. 48, p.1379-1385, 1997.

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.** v.32, n.2, 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. Short intervals between ultrasonographically-guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Anim. Reprod. science.* v.84, p 1-12, 2004.

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; MAPLOTOFT, 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.

WELLS, D. N. Transferência nuclear: a importância das células doadoras e receptoras para reprogramação nuclear e capacidade de clonagem em mamíferos. *Anais.* 24, 2010,. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2010, p.189- 206.

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

ZÚCCARI, C. E. S. N; CARRIJO, P. R; LEITE, P. A; SCALDELAI, P. R. R; RODOVALHO, N. C. M; ZANENGA, C. A; KIEFER, C; SILVA, E. V. C. Seleção em gradiente de Percoll® sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v.9, n.2, p. 358-366, 2008.