

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS: ETAPAS DE PRODUÇÃO E HISTÓRICO NO BRASIL

BOVINE EMBRYOS *IN VITRO* PRODUCTION: STEPS OF PRODUCTION AND HISTORICAL STAGES IN BRAZIL

Natielly Sampaio de Souza¹

Cristiane Caroline Abade²

RESUMO

No decorrer dos anos, os avanços obtidos na produção *in vitro* de embriões proporcionou eficiência no melhoramento genético dos rebanhos. A inovação da biotecnologia no mercado comercial agropecuário, possibilitou que uma única fêmea de alto valor zootécnico ou casos de fêmeas inaptas à reprodução, produzisse vários descendentes ao longo de sua vida reprodutiva diminuindo os intervalos entre as gerações. O processo da produção *in vitro* de embriões envolve etapas que incluem a obtenção dos oócitos, maturação, fecundação e o cultivo. O Brasil continua liderando e sendo referência para a técnica, mas ainda existe alguns entraves que estão relacionados ao elevado custo de produção especialmente pela necessidade de uma infraestrutura laboratorial e pela variabilidade entre os resultados obtidos, entre outros desafios. O que justifica o enfoque da biotecnologia é a importância de ressaltar que o Brasil possui liderança do melhoramento genético rápido favorecendo o lucro para as indústrias de carne e leite. A comercialização dos embriões *in vitro* em grande escala favorece custos viáveis e benefícios que tornam a técnica acessível, sendo de grande importância a compreensão dos requisitos que essa produção tem a nos oferecer. Portanto, o objetivo desta revisão é realizar uma retrospectiva das principais etapas da produção *in vitro* de embriões bovinos mostrando os benefícios que a técnica possui e os desafios que a mesma enfrenta.

95

Palavras-chave: Biotecnologia. Maturação *in vitro*. Fecundação *in vitro*. Cultivo *in vitro*.

ABSTRACT

Over the years, advances in embryos *in vitro* production have provided efficiency in the herds genetic improvement. Biotechnology innovation in the commercial agricultural market allowed a single female of high zootechnical value or cases of females not to reproduce to produce several descendants throughout their reproductive life, reducing the intervals between generations. The process of *in vitro* embryo production involves steps that include oocyte uptake, maturation, fertilization and culturing. Brazil continues to lead and is a benchmark for the technique, but there are still some obstacles that are related to the high cost of production especially due to the need of a laboratory infrastructure and the variability between the results obtained, among other challenges. What justifies the approach of biotechnology is

¹ Discente do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Filadélfia – UniFil.

² Docente do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Filadélfia – UniFil.

the importance of emphasizing that Brazil has leadership of the rapid genetic improvement favoring the profit for the meat and milk industries. The commercialization of *in vitro* embryos in large scale favors viable costs and benefits that make the technique accessible, and it is of great importance the understanding of the requirements that this production has to offer us. Therefore, the aim of this review is to perform a retrospective of the main stages of the *in vitro* production of bovine embryos showing the benefits that the technique possesses and the challenges that it faces.

Key-words: Biotechnology. *In vitro* maturation. *In vitro* fertilization. *In vitro* culture.

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões é uma biotecnologia reprodutiva que se iniciou para fins de produção comercial de embriões bovinos no ano 1998 pelo projeto de inovação tecnológica financiado pelas empresas Beabisa Agricultura LTDA e Gertec Tecnologia de Embriões (GALLI, 2003), sendo o Brasil líder mundial da produção *in vitro* de embriões, tornando-se assim referência na técnica, segundo Viana (2012). Houve aumento de 300% na produção de embriões por fecundação *in vitro* em um período de 15 anos, atingindo total de 666.215 em 2016, ano que a técnica superou pela primeira vez o volume de embriões produzidos *in vivo* (IETS, 2017).

Dados fornecidos pela revista ABS News (2016), informam que foram produzidos 12 mil embriões da raça Angus na Rússia pela empresa In Vitro Brasil, demonstrando a importância do Brasil na liderança da técnica e no fornecimento do melhoramento genético por todo o mundo, e no ano de 2017 a mesma empresa aumentou para 20 mil embriões produzidos da raça Angus na Rússia, expandindo seu valor de produção e conseqüentemente conquistando um papel fundamental que permitiu a exportação de embriões *in vitro* em mais de 10 países. A perspectiva nacional da produção *in vitro* de embriões deve continuar progredindo nos próximos anos, principalmente pela pecuária de corte, em especial pela produção de matrizes de raças zebuínas, enquanto em gado de leite, de preferência raças *bos taurus*, também apresentam um crescimento significativo, mas um aumento inferior quando comparado as raças de corte (VARAGO, 2008). Este aprimoramento da produção comercial de embriões bovinos *in vitro* no Brasil e no mundo é uma biotecnologia empregada na produção de animais geneticamente superiores que privilegia fêmeas

de alto valor genético ou casos de fêmeas inaptas a reprodução de forma natural, tais motivos podem ter causados por enfermidades do aparelho reprodutivo feminino (BUENO et al., 2008).

Essa técnica possibilita a reposição de animais geneticamente superiores ao plantel, maximizando a quantidade de descendentes, acelerando o progresso genético dos rebanhos bovinos e diminuindo os intervalos de gerações entre os animais (VARAGO et al., 2008). Deste modo, a produção *in vitro* de embriões permite o contato com oócito da fêmea fora do trato reprodutivo com o espermatozoide do macho que leva a formação de um indivíduo (GONÇALVES et al., 2008). Esse processo envolve etapas que incluem a coleta de oócitos, maturação *in vitro*, fecundação *in vitro* e o cultivo *in vitro* (VARAGO et al., 2008; BUENO et al., 2008). A coleta pode ocorrer de duas maneiras, sendo que a primeira forma, a partir de oócitos recuperados de folículos de ovários de vacas abatidas ou de animais que sofreram morte súbita (BUENO et al., 2008), e a outra forma é através da aspiração folicular guiado por ultrassonografia transvaginal em animais in vivo (PEIXER et al., 2018). Portanto, o objetivo desta revisão é realizar uma retrospectiva das principais etapas da produção *in vitro* de embriões bovinos mostrando os benefícios que a técnica possui e os desafios que a mesma enfrenta.

97

2 ETAPAS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

A primeira etapa da produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos depende da obtenção dos oócitos, em seguida a técnica é desenvolvida em três etapas: a maturação *in vitro*, a fertilização e o cultivo até o estágio de mórula e blastocisto que normalmente é alcançado no sétimo dia pós fecundação, sendo o momento em que os embriões estão prontos para serem transferidos ou criopreservados (DODE; RUMPF, 2002; THOMPSON, 2000; HAFEZ E HAFEZ, 2004), todas interligadas e realizadas dentro de uma infraestrutura adequada em laboratório de reprodução animal.

2.1 OBTENÇÃO DE OÓCITOS IMATUROS

Existem diversas técnicas que podem ser usadas para a coleta de oócitos para PIV. Os primeiros procedimentos realizados eram feitos através de laparotomia

ventral média, após superovulação in vivo ou pela coleta de ovários de animais *post mortem* pelo método de punção folicular, *sliciang* e/ou pela curetagem da parede folicular (LAMBERT et al., 1983; VARAGO et al., 2008; WANI et al., 2000). Com o passar dos anos, no entanto, avanços consideráveis foram obtidos que facilitaram os meios de obtenção de oócitos em animais in vivo, popularmente conhecida como a técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia – Ovum pick up (OPU), que favorece os programas de melhoramento genético (ALVES et al., 2001).

A OPU foi elaborada para satisfazer a demanda por um procedimento para coleta de complexo cumulus-oócito, menos traumática que as abordagens cirúrgicas utilizadas antigamente. Esta técnica possui vários benefícios e por ser pouca invasiva, pode ser usada em qualquer fase do ciclo estral. Obtendo-se também oócitos de fêmeas a partir de 6 meses de idade, fêmeas idosas, de animais pré-púberes ou de animais que apresentam gestação inicial até o terceiro mês e é possível fazer coleta em animais que estejam entre segunda e terceira semanas após parto (GALLI et al., 1996; VIANA; BOLS, 2005). Outro benefício da técnica é a não interferência no estado fisiológico do animal, não exige estimulação hormonal exógena e as sessões de aspiração folicular podem ser realizadas a cada 15 dias ou mensalmente (GALLI; LAZZARI, 2000; NAGAI, 2000; VARAGO et al., 2008). Essa periodicidade dos procedimentos até mesmo mensalmente, possui em torno de 40% de índices de produção em relação ao seu rendimento, podendo superar os índices obtidos pela transferência de embriões, tornando esta técnica rentável, relacionando o custo ao benefício (VARAGO et al., 2008). Além disso a técnica de OPU possibilita a coleta em animais de alto valor genético que por algum motivo possuem infertilidade, tornando-se possível a obtenção de oócitos gerando produtos descendentes (BOLS et al., 2012).

A coleta de oócitos em fêmeas bovinas é realizada pela punção folicular com uma agulha acoplada a uma sonda transvaginal, de forma que os folículos a serem puncionados são observados na tela do ultrassom. Os oócitos aspirados dos folículos devem ter diâmetro de 2 a 8 mm e os folículos menores que o mínimo de 2 mm são incapazes de recomeçar a fase de meiose e os maiores de 8 mm normalmente se deparam em estágio de atresia para a maturação, tornando essas duas formas inviáveis (GONÇALVES et al., 2008).

Nesse procedimento, um sistema de bomba a vácuo acoplado à agulha que pode ser hipodérmica descartável, libera a recuperação dos oócitos e do líquido folicular para dentro de um tubo coletor (GOODHAND et al., 1999). Após essa etapa é realizado a seleção desses baseada em características das células do cumulus e do aspecto do citoplasma do oócito, que são classificados de acordo com sua morfologia pelo número de camadas, Grau I (ótimo), Grau II (bom), Grau III (regular) e citoplasma irregular e degenerado (desnudo) em função da sua morfologia e qualidade, segundo Gonçalves et al., (2008). Em seguida os oócitos selecionados são transportados até o laboratório, para iniciar a próxima etapa de maturação oocitária *in vitro* (GOODHAND et al., 1999).

2.2 MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS

Segundo Fissore et al., (2002) o desenvolvimento da maturação oocitária consiste em uma série complexa de eventos nucleares e citoplasmáticos. Este procedimento foi observado por Hardy et al., (2000), onde o processo da maturação nuclear dos oócitos, a partir da retirada do ambiente folicular, era um processo simples na espécie bovina, verificando que através do cultivo *in vitro* dos oócitos, que o fator inibitório da maturação desaparecia, permitindo o desenvolvimento dos oócitos fora do ambiente folicular. Estes oócitos inclusos nos folículos primordiais presentes no ovário, se encontram em estágio adormecido, além de estarem pequenos e imaturos. Durante as ondas foliculares com intervalos regulares na espécie bovina, é o momento em que os oócitos começam a crescer e maturar mas, somente um oócito será ovulado, o dominante, e o restante sofrerá atresia de todo esse potencial *in vivo* (HARDY et al., 2000). Com essa descoberta foi possível resgatar uma grande quantidade de oócitos imaturos dos ovários e cultivá-los *in vitro* até a maturação (GILCHRIST et al., 2008). De acordo com Chian et al. (2004) os oócitos maturados *in vitro* não têm o mesmo potencial de desenvolvimento que os oócitos maturados *in vivo*.

Diferentes condições de cultivo *in vitro* e protocolos já foram testadas para a maturação de oócitos, e o TCM 199 é o meio mais comum entre os laboratórios de produção *in vitro* e são geralmente suplementados com substâncias de soro fetal bovino (SFB) e gonadotrofinas (FSH, LH e estradiol-17 β), aminoácidos como L-glutamina, bicarbonato de sódio, piruvato de sódio, lactato, vitaminas e antibióticos,

em condições controladas de atmosfera gasosa e temperatura (RODRIGUES et al., 2000; GANDHI et al., 2000; SMETANINA et al., 2000; PALMA, 2008). Os oócitos são mantidos em um meio de maturação, sendo comumente utilizado um meio coberto por óleo mineral que auxilia a não ocorrer a evaporação do meio de maturação e facilita a rápida absorção de hormônios esteroides adicionados ao meio (GONÇALVES et al., 2008). Dito isto, o período necessário para a maturação dos oócitos para a espécie bovina ocorre de 18 a 24 horas em atmosfera controlada contendo 5% de CO² em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008). Esse processo permite e envolve uma série de transformações nucleares, citoplasmáticas e moleculares que tornam o gameta feminino apto a ser fecundado (SMITZ et al., 2004). Assim, para que as etapas da maturação oocitária ocorram *in vitro*, é importante que os meios usados durante este período mimetizem as condições encontradas durante o processo de maturação *in vivo* (SANGILD, 2000).

O desenvolvimento dos oócitos pós-maturação pode ser afetado por uma série de fatores, como temperatura, pH, osmolaridade, tensão de CO² e O² e uso do soro e células somáticas (SANGILD, 2000; GONÇALVES et al., 2002). Logo após o tempo de incubação da MIV, os oócitos completam a maturação com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e estão prontos para a fecundação (AVELINO et al., 2002).

100

2.3 FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

A fertilização *in vitro* é descrita por PALMA (2008) como a etapa em que os oócitos maduros são cultivados com os espermatozoides e após fecundados, gerando em seguida um zigoto, que evoluirá até o estágio de blastocisto (MELO et al., 2016). A FIV é realizada por um período de 18 a 22 horas, em temperatura de 38,5°C, atmosfera com 5% de CO² em ar e umidade a 95% (CORRÊA, 2006). Outros autores descrevem também a realização por um período 22-24 horas com temperatura de 39°C em estufa de 5% de CO².

Nesta fase ocorre a combinação do material genético dos gametas e a formação do zigoto. O meio mais adequado para utilização de acordo com alguns autores para a fecundação *in vitro* é o Fert-TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato), que possui agentes capazes de promover a capacitação espermática, como a heparina (MELO et al., 2016). Para isto, são utilizados espermatozoides de palhetas

de sêmen congelado sendo convencional ou sexado e a técnica de separação dos mesmos mais utilizada atualmente é pelo gradiente Percoll para a obtenção da fração espermática viva após a descongelação (GALLI, 1996; VARAGO et al., 2008). O Percoll é composto por partículas de sílica coloidal coberto com polivinilpirrolidona, preparado em diferentes concentrações para formar um gradiente para separação espermática (GONÇALVES et al., 2002; GORDON, 2003). Embora outras técnicas possam ser utilizadas como o “swim-up” um método baseado na mobilidade dos espermatozoides móveis migrarem do sedimento formado após centrifugação para um meio de cultura enriquecido sobreposto aos mesmos. De acordo com YOUNG (1998), a concentração utilizada para a fertilização *in vitro* é de 2×10^6 espermatozoides / ml, calculada de acordo com a motilidade e concentração da fração viva de espermatozoides obtida após a centrifugação em gradiente Percoll.

2.4 CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Esta etapa compreende o desenvolvimento do zigoto até o momento do estágio de blastocisto, que consiste em fases extremamente importantes como clivagem, ativação do genoma embrionário, compactação dos blastômeros, diferenciação da distinção embrionária, formação e expansão da blastocèle e rompimento da zona pelúcida (LONERGAN et al., 1999; BUENO; BELTRAN, 2008; LIMA; SOUZA, 2009). De acordo com FAIR et al (2001) as características dos embriões preparados *in vitro* é inferior à dos embriões produzidos *in vivo* por possuírem geralmente coloração mais escura em seu citoplasma e menor densidade, devido conteúdo lipídico. Slimane et al., (2000) afirmam que embriões produzidos *in vitro* contêm uma zona pelúcida mais frágil, com grande predisposição a anormalidades cromossomais. Podem ocorrer vários defeitos no momento da produção, como falta de compactação da massa celular, formação de vacúolos na massa embrionária, formação prematura de blastocèle, alteração na razão de massa celular interna em relação às células trofoblásticas, alterações na expressão gênica e metabolismo celular (LONERGAN et al., 2006).

Para o sucesso na preparação do cultivo *in vitro* é extremamente necessário que as composições dos meios usados artificialmente sejam similares ao ambiente e aos fluidos do útero e do oviduto de uma vaca durante o início de uma gestação,

sendo um dos pontos mais importantes para o desenvolvimento embrionário, que é dependente do suporte à nutrição celular. Figueiredo (2010), prioriza a relevância que os nutrientes, pH, hormônios e oxigênio devem estar presentes nas mesmas quantidades ou aproximadas do ambiente uterino.

Após 24 horas da fecundação *in vitro*, os oócitos são desnudados com auxílio de uma pipeta e transferidos para o meio de cultivo *in vitro* (CIV), um meio comum utilizado pelos laboratórios para essa etapa é o meio Synthetic Oviductal Fluid (SOF), originado através de fluido do oviduto de fêmeas bovinas, que expressam taxas significativamente agradáveis sem o aparecimento de células somáticas (HOLM et al., 1999; WATSON et al., 2000). De acordo com vários autores, o cultivo embrionário *in vitro* requer um ambiente adequado, com tempo de variação de todo o processo de desenvolvimento de 7 a 9 dias dependendo de cada forma, técnica e meios utilizados pelos laboratórios em suas rotinas (podendo ser interpretado da seguinte forma: no dia OPU sendo considerado como dia-1 (D-1) e após 24 horas é realizada a fase de fecundação *in vitro* que é classificada como dia 0 (D0), passados 24h, temos o dia-1 (D1) que é a etapa de cultivo *in vitro* e com mais 48 horas dia-3 (D3) sendo realizadas as etapas de 1º feeding e clivagem. Após estes procedimentos realizados, espera-se mais 48 horas, o dia-5 (D5), momento do 2º feeding, no dia 6 (D6) realiza-se a previsão e no dia 7 (D7) acontece a saída dos embriões para envase a fresco ou congelamento). As estufas têm atmosfera controlada (5% de O², 5% de CO² e 90% de N²) e umidade saturada e com temperatura controlados em torno de 39°C (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008).

102

2.5 CLASSIFICAÇÃO E DESTINO DOS EMBRIÕES PRODUZIDOS IN VITRO

O método de classificação morfológica é essencial para a seleção dos embriões viáveis, tanto para a transferência a fresco como pelas técnicas de criopreservação. Atualmente as mais utilizadas são a directtransfer e a técnica de vitrificação de embriões. A descrição dos critérios de classificação quanto as qualidades dos embriões são de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE, 2014), divididos em categorias: mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto em eclosão e blastocisto eclodido. A qualidade dos embriões também é classificada pela viabilidade, cor,

formato, integridade da zona pelúcida e aspecto morfológico dos mesmos (MARTINEZ; SOUZA, 2007).

3 CONCLUSÃO

Os desafios que esta técnica enfrenta estão relacionados ao alto custo, dependência de uma infraestrutura laboratorial e pela variabilidade dos resultados referentes às taxas de mórulas e blastocistos, incluindo o tempo gasto em todo o procedimento para a produção *in vitro* de embriões, que se inicia desde o momento da sincronização das receptoras, seleção de doadoras, aspiração folicular dos oócitos, evolução *in vitro* de embriões e o processo da transferência dos embriões (MIRANDA et al., 2007). De acordo com Rumpf (2007), havia limitações na dificuldade na criopreservação dos embriões, menor viabilidade dos oócitos obtidos de bezerras em relação aos de vacas e novilhas, além de bezerros com maior peso ao nascimento com período de gestação prolongado, aumenta a incidência de abortos e de anormalidades congênitas.

103

Em 2016 a empresa ABS Pecplan desenvolveu um melhoramento genético já pronto via embriões congelados por uma tecnologia exclusiva IVB Transfer, garantindo eficiência e viabilidade do produto contribuindo para o sucesso da técnica. Neste ano os resultados foram de mais 53% de taxa de concepção através do uso da biotecnologia. Um dos maiores clientes que a ABS possui, transferiu no mesmo ano 1.100 embriões, conforme dados fornecidos pela revista ABS News (2016). Em 2017 foi registrada pela ABS NEO uma média de concepção de 48% no Brasil, sendo um valor muito expressivo com uso da tecnologia no país e foram vendidos 6 mil embriões em todas as regiões brasileiras comprovando a eficiência da tecnologia chegando a mais de 60% a taxa de concepção em algumas propriedades, demonstrando ser uma ferramenta eficiente e lucrativa para quem procura melhoramento genético com resultados rápidos que garantem facilidade e flexibilidade de manejo dentro das propriedades.

Através desses dados percebemos a importância da técnica e seu crescimento no país, mesmo a pecuária em várias regiões enfrentando dificuldades de logística e de assistência veterinária especializada para o trabalho de produção *in vitro* de embriões com genética própria, atualmente o quadro do uso da biotecnologia está sofrendo modificações benéficas, através de produtores que

procuram rentabilidade e lucro com o melhoramento genético. O uso dos embriões congelados pela técnica IVB Transfer, aumentou a demanda proporcionando um custo viável aos produtores para investirem nessa tecnologia tornando-se mais acessível, e para que haja sucesso é necessário ter manejo operacional, sanitário e nutricional adequados dentro das propriedades. O estudo demonstra que independente do meio de produção, este deve seguir uma conduta determinada, da mais simples a mais elaborada, como os procedimentos da produção *in vitro*. Os métodos e meios utilizados sofrem pequenas variações nos laboratórios influenciando nos resultados que cada um destes alcança, como a qualidade dos embriões, a produção, bem como a capacidade de produção dos mesmos, mostrando que a dedicação e comprometimento aliados ao constante crescimento biotecnológico são o marco fundamental para o sucesso da produção *in vitro* de embriões bovinos.

REFERÊNCIAS

104

AVELINO, K.B., VANTINI, E., SENEDA, M.M., et al. In vitro production of embryos of cows with acquired infertility. **Theriogenology**, [s.l.], v.57, p.656, 2002.

ALVES, J. D. R.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; CALDAS, J. G. L.; FILHO, A. S. S.; BARRETO, M. B. P. Altas concentrações de FSH-p na maturação *in vitro* de oócitos *Bos indicus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 645-649, 2001.

ABS NEWS. A Solução Genética Que Vai Revolucionar a Produção de Carne no Brasil. **Rev. ABS News**. Uberaba, p. 22, ago. 2017. Disponível em: https://www.abspecplan.com.br/absnews/ABSNews_2017_08.pdf. Acesso em: out. 2018.

ABS NEWS. Touros Americanos Chegam a Central da ABS. **Rev. ABS News**. Uberaba, p. 18-21, dez. 2016.. Disponível em: https://www.abspecplan.com.br/absnews/ABSNews_2016_12.pdf. Acesso em: out. 2018.

BLONDIN, P. Status of embryo production in the world. **Anim. Reprod**, [s.l.], v. 12, n. 3, p. 356-358, 2015.

BOLS, P. E. J., JORSSSEN, E. P. A., GOOVAERTS, I. G. F., LANGBEEN, A. ; LEROY, J. L. M. R. 2012. High through put non invasive oocyte quality assessment: thesearch continues. **Animal Reproduction**, [s.l.], v. 9, p. 420-425.

BUENO, P.; A. BELTRAN, M. P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Rev. Elet. Med. Vet.**, [s.l.], n.11, p. 1-7, 2008

CHIAN, R. C., LIM, J. H., TAN, S. L. State of the heart in in-vitro oocyte maturation. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol**, [s.l.], v.16, p. 211-219, 2004.

CORRÊA, G. A. **Tensão de oxigênio durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos: efeito na produção e expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo**. 2006. 76f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2006.

DODE, M. A. N.; RUMPF, R. In: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Produção *in vitro* de embriões**: eficiência, limitações e perspectivas futuras. Brasília: [s.n.]: 2002.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos taurus indicus*) cattle. **Theriogenology**, [s.l.], v.47, p.1489-1505, 2010.

FISSORE, R. A., KUROKAWA, M., KNOTT, J., ZHANG, M., SMYTH, J. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. **Reproduction**, [s.l.], v.124, p. 745-754, 2002.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVF in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, [s.l.], v.42, p.371-379, 1996.

GALLI, C., DUCHI, R., CROTIL, G. et al. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, [s.l.], v.59, p. 599-616, 2003.

GANDHI, A. P., LANE, M., GARDNER, D. K., KRISHER, R. L. A single medium supports development of bovine embryo through out maturation, fertilization and culture. **Human Reprod**, [s.l.], v.15, p.395-401, 2000.

GILCHRIST, R. B., LANE, M., THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Hum Reprod Update**, [s.l.], v.14, p.159-177, 2008.

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**, Belo Horizonte, v. 31, p. 212-217, 2007.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2008.

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção in vitro de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, p. 195-226, 2002.

GOODHAND, K. L.; WATT, R. G.; STAINES, M. E.; HUTCHINSON, J. S. M. *In vitro* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine Don or spirated at

different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, n. 5, p. 951-961, 1999.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. 2. ed. London: CABI Publishing, 2003.

HAFEZ, B., HAFEZ, E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole, 2004.

HARDY, K., WRIGHT, C. S., FRANKS, S., WINSTON, R. M. L. *In vitro* maturation of oocytes. *BrMed Bull*, v.56, p.588-602, 2000.

HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H. et al. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using. **Theriogenology**, v.52, p. 683-700, 1999.

IN VITRO BRASIL. **Manual de Procedimentos Operacionais Padrão (POP) da In Vitro Brasil S/A**. 2016. Disponível em:
http://www.ebserh.gov.br/documents/17082/374045/POP_ENFERMAGEM.pdf/41341424-745e-45fb-8baa-ea9541523f39. Acesso em: 19 set. 2018.

IETS. International embryo transfer society. Statistics and data retrieval committee report. **Embryo Transfer Newsletter**. 2017.

LAMBERT, R. D.; SIRARD, M.A.; BERNARD, C.; BELAND, R.; RIOUX, J.E.; LECLERC, P.; MENARD, D.P. BEDOYA, M. *In vitro* fertilization of bovine oocytes matured in vivo and collected at laparoscopy. **Theriogenology**, [s.l.], v. 25, n. 01, p. 117-133, 1983.

106

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F.; RIEGER, D.; HUMBLLOT, P.; BOLAND, M. P. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. **J. Reprod. Fertil.**, [s.l.], v. 117, p. 159-167, 1999.

LIMA, I. M. T.; SOUZA, A. L. Desenvolvimento e sobrevivência de embriões no período de pré-implantação: enfoque em ruminantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, [s.l.], v. 33, p.194-202, 2009.

MARTINEZ, I. N.; SOUZA, L. C. **Transferência de embrião e fertilização “in vitro” (FIV) em bovinos**. 2007. 88 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Produção e Reprodução em Bovinos) - Universidade Castelo Branco, Centro de Ciências Agrárias, Rio de Janeiro, 2007.

MELO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte- MG, v.40, n.2, p. 58-64, 2016.

NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, [s.l.], v.55, p.1291-1301, 2001.

OLIVEIRA, Clara Slade; SERAPIÃO, R. V.; QUINTÃO, Carolina Capobianco Romano. **Biotécnicas da reprodução em bovinos**: minicursos ministrados durante

o 3.º Simpósio "Biotécnicas da Reprodução em Bovinos" no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica. Brasília: Embrapa Gado de Leite, 2014.

PALMA, G. A. Producción *in vitro* de embriones bovinos. In: PALMA, G. A. **Biotechnología de La reproducción**. 2. ed. Mar del Plata - Argentina, p 313-380, 2008.

PEIXER, P.F; SANTOS, K.J.G.S; SANTOS, A.P.P; BACKES, C; SANTOS, J.F.D; CASTRO, C.S. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista ESPACIOS**, [s.l.], v. 39, n. 16, 2018. Disponível em: <http://www.revistaespacios.com/a18v39n16/a18v39n16p02.pdf>. Acesso em: 2 out. 2018.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p. 229-233, 2007.

RODRIGUES, C.F.M., GARCIA, J.M. Fecundação *in vitro* em bovinos: aplicação comercial. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 28, p. 186-187, 2000.

SANGILD, P.T., SCHMIDT, M., JACOBSEN, H., et al. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organweights in fetal and newborn calves derived from *in vitro* produced bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 1495-1504, 2000.

107

SBTE- NORMAS DA SOCIEDADE DE TECNOLOGIA E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES. Disponível em: <http://www.sbte.org.br>. Acesso em: 11 set. 2018.

SMETANINA, I. G., TATARINOVA, L. V., KRIVOKHARDCHENKO, A. S. The effect of the composition of the culture media on bovine oocyte maturation and embryo development *in vitro*. **Ontogenez**, v. 31, p. 139-143, 2000.

SMITZ, J. E. J.; NOGUEIRA, D.; VANHOUTTE MATOS, D. G.; CORTVRINDT, R. N. Oocyte: *in vitro* maturation. In: SUH, C. S.; SONNTAG, B.; ERICKSON, G. F. The ovarian life cycle: a contemporary view. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, [s.l.], v. 3, p. 5-12, 2004.

THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryometabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Anim. Reprod. Sci**, v. 60-61, p. 263-275, 2000.

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

VIANA, J. H. M.; BOLS, P. E. J. 2005. Variações biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus-oócitos por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s.l.], v. 33, p. 1-4.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A. 2007. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s.l.], v. 3, p. 915-924.

VIANA, J.H.M. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. **O Embrião**, [s.l.], v 16, n. 51, p. 6- 10, 2012.

WANI, N. A.; WANI, G. M., KHAN, M.Z.; SALAHUDIN, S. Effect of oocyte harve Sting technique son *in vitro* maturationand *in vitro* fertilization in sheep. **Small Rumin. Res.**, [s.l.], v. 36, p. 63-67, 2000.

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

YOUNG, L.E., SINCLAIR, K.D., WILMUT, I. Large of spring syndrome in caUle and sheep. **Rev. Reprod.** [s.l.], v.3, p. 155-163, 1998.