

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

FELIPE EDUARDO LUEDKE

**ASPECTOS TÉCNICOS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS –
REVISÃO**

**Dom Pedrito - RS
2018**

FELIPE EDUARDO LUEDKE

**ASPECTOS TÉCNICOS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS –
REVISÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Zootecnia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Zootecnia.

Orientador: Adriana Pires Neves

**Dom Pedrito - RS
2018**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

L948a Luedke, Felipe Eduardo

Aspectos técnicos da produção in vitro de embriões
bovinos - revisão / Felipe Eduardo Luedke.
44 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade
Federal do Pampa, ZOOTECNIA, 2018.

"Orientação: Adriana Pires Neves".

1. Biotécnicas da Reprodução. 2. Embriões. 3. Pecuária. 4.
Produção in vitro. 5. Zootecnista. I. Título.

FELIPE EDUARDO LUEDKE

**ASPECTOS TÉCNICOS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS –
REVISÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Zootecnia da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Zootecnia.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 26 de junho de 2018.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Adriana Pires Neves
Orientador
UNIPAMPA

Profª Drª Larissa Picada Brum
UNIPAMPA

Prof. Dr Eduardo Brum Schwengber
UNIPAMPA

Dedico este trabalho, aos meus avós, que me ensinaram o gosto pelas coisas do campo e que mesmo sem perceber, deram rumo ao meu destino.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe Gelsi pelo amor de todas as horas, pelo carinho e por atender sempre, a tudo que eu precisei. Sou grato por todos os dias de preocupação e por toda a dedicação. És a melhor mãe do mundo.

Agradeço ao meu pai Vilson pela forma como hoje encaro o mundo, agradeço por todo o apoio, pela dedicação e principalmente por ser o meu melhor amigo, todos os dias. Lembro de todas as aventuras. Lembrarei a vida inteira da frase - "Tudo bem, mas não conta pra tua mãe..."

Agradeço aos meus avós Julieta, Gelceí e Maria, por todo o cuidado, por todo o amor e por todo o carinho. Tive uma infância maravilhosa, fui o neto mais amado que existiu na face dessa Terra. Agradeço pelos ensinamentos, pelos bifés-na-chapa, pelos pedacinhos de carne escondidos dos demais, pelos presentes e pelos passeios mundo afora no "Fuca amarelo do vô". Com vocês aprendi que a Urtiga queima, que - "...o milho dá força...", que não se coloca o pé todo no estribo, e que, só se coloca sal, depois de se fritar a carne...Sou grato por tudo. A saudade de vocês é diária, e de minha vó Julieta, será eterna.

Agradeço à minha namorada Flávia Luiza Lavach pelo carinho, pelo empenho, e pelo amor de todos os dias. Agradeço por cada palavra de conforto e por ser o meu porto seguro sempre que precisei. Agradeço pelos dias que passamos juntos, pelos vinhos na janela, pelas receitas mirabolantes e pelos almoços às cinco da tarde. Lembro de cada risada, de cada tarde de brincadeira, de cada sorvete, de cada Burguer Boss e de cada passeio. Desculpe pelos dias que não pude te dar atenção que merece. Tenho orgulho de ser o namorado desta mulher forte e incrível. Sou grato pelos sorrisos, pelo olhar carinhoso e pelos sonhos que hoje, sonhamos juntos. Caminhamos e caminharemos juntos, tenho certeza...Ah e não esqueça que o Buldogue se chamará Bóris.

À minha irmã Julia, ainda tão jovem, agradeço por cuidar dos nossos pais, por ser "esteio" e por levar a vida com dedicação. Ainda que não quisesse, hoje cresceu. Tenho muito orgulho de ti.

Aos primos Anderson, Juliana, Maurício, Andreia e Camila, que a vida insiste tanto em afastar, digo que sinto saudade das crianças felizes que éramos. Sei que sentem também.

Agradeço ao amigo Marcos Goulart de Oliveira, a pessoa do maior coração que já conheci, e mesmo convivendo com seu mau humor matinal, vou levá-lo para o resto da vida. Tua alegria e simplicidade com que encara a vida foram grandes ensinamentos para mim.

Lembrarei com certeza dos amigos Hugo Balbuena e Mateus Martins. Hugo pela dedicação com que trabalha e Mateus pelas chatisses diárias. Foram muitos momentos juntos, muitos trabalhos e muitas risadas. Aproveito para pedir desculpas ao Mateus por todas as brincadeiras e pela importunação diária, eu sei que eu sempre provocava. É que era muito engraçado. Aproveito também para reconhecer que eu talvez seja, alguns milímetros, mais baixo do que vocês.

Ao amigo Gustavo Xavier ficam meus agradecimentos pela amizade, pela lealdade e pelo companheirismo. Me ensinou os benefícios da Coca-Cola, do gelo e de suas misturas. Lembrarei para sempre do grande amigo que foi.

Agradeço ao amigo Luan Felipi Nunes e ao amigo Frederico Guerra. Luan foi além de amigo um grande “ensinador”, prático, fazia as coisas para o mesmo minuto, me ensinou os benefícios do Microsoft Excel e foi um grande companheiro de Equus. Ao Frederico agradeço pela lealdade, pela humanidade e pela amizade, apesar da pouca idade mental. Tens uma grande capacidade acadêmica e é muito inteligente.

Agradeço também à Professora Adriana Pires Neves pela orientação, pela abertura do seu grupo de pesquisa durante cinco anos, pela orientação nos trabalhos acadêmicos, pelas viagens pelo Rio Grande à fora, pelos mates e pelas risadas. Tem um gênio de agressividade as vezes, mas tem um coração maravilhoso. Tenho orgulho de ser seu orientado, dos ensinamentos e do encaminhamento que deu para minha futura atuação profissional. Lembrarei para sempre de sua frase enquanto escrevíamos minha solicitação de estágio na USP – “...E daí pra frente o mundo é teu, meu filho”.

Sou grato também à Professora Etiane Skrebsky Quadros por todos os ensinamentos, pela dedicação em cada trabalho que fazíamos, agradeço por me ensinar os primeiros passos na vida acadêmica. Pela amizade, pelos conselhos e pelo carinho de mãe com que trata todas as pessoas de seu convívio. Aprendi muito com as plantinhas, as sementinhas, as folhinhas e as árvorezinhas...

Agradeço à Professora Luciane Segabinazzi pelos seus “mates amigos” pelos conselhos e pelas tardes de conversa, onde falávamos de tudo que existia de errado no mundo. Agradeço pelo incentivo e pela amizade verdadeira.

Agradeço ao Professor Sérgio Ivan dos Santos por todos os mates, pelas cervejas especiais, pelos vinhos-do-porto. Agradeço também pelas politicagens e pelos assuntos que discutíamos e discutimos até hoje. Foste um grande amigo, que lembrarei para sempre.

Agradeço à Professora Larissa Picada Brum pela amizade, pelos mates, pelas caronas e pelas risadas. Compartilhamos de muitas ideias em comum, o mundo seria muito melhor se conseguíssemos colocá-las em prática. Tem o olho clínico de uma mãe que sabe quando o filho tem algum problema. És uma pessoa de coração nobre e valioso. É uma grande amiga.

Professor Eduardo Brum Schwengber, o cara da loucura, da irreverência, da amizade, da lealdade. Possui o look mais *fashion* que uma festa junina requer. Agradeço pelos anos de convívio, pelas festas em sua mansão, pelos ensinamentos e pelas palhaçadas. És um amigo maravilhoso, todos os que têm o privilégio de conviver contigo sentem a leveza e a felicidade de sua alma.

À Professora Angélica Pinho ficam os agradecimentos pela dedicação com o curso e com a nossa profissão. És uma guerreira incansável, a Zootecnia brasileira saberá reconhecer. Tem um coração maravilhoso e, mesmo que tente, não consegue esconder, seu instinto de mãe fala mais alto. Agradeço pelos Zootecs, pelas viagens, pela irreverência e pela amizade.

À Professora Gládis Ferreira agradeço pelas aulas maravilhosas, pelo incentivo, e pelo amor de mãe. És uma grande professora, orgulho-me muito de ter em minha memória, seus ensinamentos técnicos.

Ao Professor Paulo Lopes, agradeço pela dedicação, ainda que sempre perdido e atrapalhado, sabe resolver os problemas de todos. Sempre com um sorriso no rosto e com bom humor, nunca nega um mate a ninguém. É um irmão mais velho. É um grande amigo.

Agradeço ao Professor José Acélio pelos grandes ensinamentos na Forragicultura, lembro também de todos os “causos”. Aproveito para dizer que não carrego mágoa de todas as cuias geladas que me entregou, toda vez que alcancei-lhe um mate.

Agradeço aos amigos da ONG Amigo Bicho por todo o apoio e por entenderem todas as vezes que eu fazia algo errado. Foram grandes amigos e contribuíram muito para o meu crescimento pessoal.

Aos amigos da “Confraria das Terças”, saibam que sentirei saudade de nossas jantas, risadas e amizade.

Aos amigos que não nomeei saibam que lembrarei de vocês todos os dias, lembrarei também da cidade e da Universidade que nos acolheu.

Obrigado ao Curso de Zootecnia e à Universidade Federal do Pampa, tentei contribuir com o pouco que pude. Serei grato pelo resto da vida.

“É muito melhor ousar fazer coisas grandiosas, triunfar gloriosamente, mesmo que com alguns fracassos no meio do caminho, do que se igualar às pobres almas que não aproveitam nem sofrem muito, pois vivem na penumbra cinza de quem não sabe o que é a vitória nem a derrota”

(Theodore Roosevelt)

“E assim, depois de muito esperar, num dia como outro qualquer, decidi triunfar...
Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo buscá-las.
Aprendi que de nada serve ser luz se não iluminar o caminho dos demais.
Naquele dia, decidi trocar tantas coisas...
Naquele dia, aprendi que os sonhos existem para tornarem-se realidade.
E desde aquele dia já não durmo para descansar... simplesmente durmo para sonhar.”

(Walt Disney)

RESUMO

A pecuária brasileira está em constante crescimento, seja em números na balança comercial ou através do emprego de técnicas que sejam capazes de maximizar os resultados e os índices produtivos. Dentre estas técnicas destaca-se a Produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE), que juntamente com as demais biotécnicas da reprodução, foi responsável pela grande expansão da pecuária brasileira, reduzindo o intervalo entre gerações e selecionando, cada vez mais os reprodutores. Além disso a PIVE é capaz de gerar produtos viáveis de animais que não estão em condições de se reproduzir, é o fato de animais jovens, animais com problemas reprodutivos, animais mortos e até extintos. A técnica em si é um procedimento complexo, que envolve várias etapas, que vão desde a colheita do oócito, em animais vivos ou em ovários retirados de carcaças, passando pela maturação, fertilização e cultivo em laboratório, até a classificação dos embriões viáveis e a transferência à fêmea receptora. Seguindo-se nesta linha de pensamento e levando em consideração todos os benefícios desta técnica para o agronegócio brasileiro, o objetivo deste trabalho foi revisar o processo de produção *in vitro* de embriões bovinos a partir de ovários coletados em abatedouro, desde a coleta do material biológico até a criopreservação ou transferência do embrião produzido.

Palavras-Chave: Biotécnicas da reprodução. Embriões. Pecuária. Produção *in vitro*. Zootecnista.

ABSTRACT

Brazilian livestock breeding is constantly growing, due to trade balance or through employment of technologies to improve results and productive indexes. Among these, stands out *in vitro* embryo production (IVP) in bovine cattle, which along with other reproductive techniques, is responsible for a greater expansion in Brazilian cattle breeding, so reducing generation interval, and selecting animals. Besides, IVP can generate viable products from animals that are no longer able to breed, with reproductive problems, dead or even extinct. This technique is a complex procedure, in several steps, since oocyte collection from live or slaughter animals, undergoing maturation, fertilization and laboratory culture, to classifying viable embryos and transferring them to the female receptor. Considering every benefit of this technique to brazilian agribusiness, the aim of this work was to review the process of IVP of bovine embryos from slaughterhouse ovaries.

Keywords: Reproductive biotechnologies. Embryos. Livestock breeding; *In vitro* production. Animal scientist.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo de recipiente térmico.....	23
Figura 2 – Esquema da PIV, com aspiração folicular com agulha.....	25
Figura 3 – Etapas da maturação nuclear.....	28
Figura 4 – Ovócito bovino na FIV com espermatozoides aderidos.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos embriões quanto à qualidade	32
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	Revisão de Literatura.....	17
2.1	Embriologia.....	17
2.1.1	Conceito.....	17
2.1.2	O princípio da Embriologia.....	18
2.2	Biotecnologia.....	19
2.3	Biotécnicas da Reprodução Animal.....	20
2.3.1	Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	21
2.3.1.1	Coleta de ovários em abatedouro.....	22
2.3.1.2	Obtenção de oócitos.....	24
2.3.1.3	Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	26
2.3.1.4	Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	29
2.3.1.5	Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	31
2.3.1.6	Classificação de embriões.....	31
2.4	Criopreservação de embriões.....	31
2.5	Transferência de embriões.....	35
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
4	REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, desde seu período de colônia, vem mantendo os traços de economia baseada nos setores agropecuários. Mesmo com os avanços industriais e tecnológicos, o Agronegócio vem se mantendo por tempos como carro chefe da balança comercial brasileira (ABIEC, 2016)

Em 2015, o saldo da balança comercial do país foi de US\$19,69 bilhões. As exportações do agronegócio, que atingiram US\$88,22 bilhões, contribuíram para o saldo positivo do setor, que por sua vez foi fundamental para o saldo positivo da balança comercial brasileira. A cadeia produtiva da pecuária do Brasil movimentou mais de R\$483,5 bilhões em 2015, registrando um crescimento de mais de 27% sobre o ano anterior. Já as exportações de carne bovina geraram receita de US\$5,9 bilhões em 2015, representando 3% de tudo o que o Brasil exportou em 2015 (ABIEC, 2016).

É neste cenário grande, tanto em desenvolvimento econômico quanto técnico, que o emprego das diferentes biotécnicas da reprodução vem em constante crescimento, seja ele em números ou em eficiência de resultados. Todo este desenvolvimento da pecuária nacional está intimamente associado ao emprego das diferentes biotécnicas da reprodução, e o Brasil é detentor de um bom nível técnico-científico dessas biotécnicas, se destacando como um dos maiores produtores de embriões *in vitro*, não só pelo domínio da técnica, mas pela qualidade do seu rebanho (DA SILVA et al., 2015).

Com a expansão do mercado, várias biotécnicas foram desenvolvidas e aprimoradas, principalmente na espécie bovina. Inicialmente, a inseminação artificial (IA) teve um importante papel na disseminação do material genético do macho e, posteriormente, técnicas como o controle do ciclo estral, a superovulação (SOV) e a transferência de embriões (TE) proporcionaram um aumento na possibilidade da multiplicação do material genético da fêmea (DAYAN, 2001).

A ultrassonografia somou-se às técnicas existentes como importante recurso para o monitoramento da atividade ovariana, bem como a produção de embriões *in vitro* (PIV), com oócitos de animais abatidos, constituiu novo marco na pesquisa da reprodução em bovinos (DAYAN, 2001).

A possibilidade de obtenção de oócitos de animais vivos surgiu com a aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU), que foi responsável pelo intenso aproveitamento do material genético de fêmeas superiores, além de proporcionar prole de fêmeas de alto valor genético, oriundas de animais com problemas reprodutivos adquiridos, novilhas pré púberes, vacas gestantes e senis, sendo responsável pelo aumento da velocidade de multiplicação dos animais de alto valor genético e por uma grande pressão de seleção (RENESTO, 2004).

O aprimoramento dos sistemas envolvidos no processo de produção *in vitro* de embriões na espécie bovina a partir de oócitos recuperados de folículos de ovários de vacas abatidas e também através da OPU, têm sido fundamental para o estudo e compreensão de vários fenômenos e mecanismos biológicos que ocorrem durante este período, desde a maturação dos oócitos, o processo de capacitação espermática e fertilização, até o início do desenvolvimento embrionário em fase de pré-implantação (HOSHI, 2003). Seguindo-se nesta linha e de acordo com este cenário de desenvolvimento, o objetivo deste trabalho foi entender os diferentes processos da PIV que ocorrem desde o abate das fêmeas bovinas até a obtenção do embrião apto a ser transferido à fêmea receptora, passando por toda a parte logística e laboratorial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Embriologia

2.1.1 Conceito

O conceito tradicional que define a embriologia é o estudo de embriões. A embriologia estuda o desenvolvimento de uma célula que é um ovo fertilizado, até se tornar um organismo pronto para eclosão como no caso dos moluscos (BARBOSA, 1995). Durante o desenvolvimento embrionário, a diversidade celular é determinada através da diferenciação, enquanto o processo da morfogênese é o que organiza diferentes células em tecidos e órgãos, e o crescimento é o aumento em tamanho e número celular. A segunda maior função no desenvolvimento é a reprodução, isto é, a geração de novos indivíduos (BARBOSA, 1995).

Segundo Montanari (2013), a Embriologia é mais abrangente que aquilo que conceitualmente se apresenta, no caso, o estudo dos embriões, pois ela não se restringe apenas ao período embrionário, visto que períodos anteriores como a gametogênese e a fertilização, necessários para a produção do embrião, e acontecimentos posteriores, como os do período fetal, também são objetos de estudo. Logo, a Embriologia aborda e estuda, desde a produção dos gametas até o nascimento do feto.

Com outro entendimento, Moore (2008) traz a seguinte informação: “Embriologia é ramo da biologia e da medicina que estuda o desenvolvimento do ser vivo desde a fecundação do ovo até o final do estado embrionário”.

2.1. 2 O princípio da Embriologia

Os primeiros estudos embriológicos foram feitos por Hipócrates (460-377 a.C.) e Aristóteles (384-322 a.C.), que analisaram o desenvolvimento de aves, por estes estudos Aristóteles é reconhecido como o fundador da Embriologia (MONTANARI, 2013). Os estudos embriológicos pioneiros registrados estão nos livros de Hipócrates (MOORE, 2008).

Lazzaro Spallanzani demonstrou que tanto o óvulo quanto o espermatozoide eram necessários ao desenvolvimento do novo indivíduo e concluiu que o espermatozoide era o agente fertilizante, que desencadeava o processo de desenvolvimento (MOORE, 2008).

Em 1673, o embriologista italiano Marcelo Malpighi (1628-1964), fez representações detalhadas do embrião de aves, e Lazzaro Spallanzani (1729-1799), apesar de ser um ovista, em um de seus trabalhos, usando uma seringa, impregnou uma cadela com sêmen e verificou que os filhotes assemelhavam-se à mãe e ao cão que fornecera o sêmen, contribuindo para o descrédito em relação à “teoria da pré-formação”, onde se acreditava que o embrião era uma redução do adulto (MONTANARI, 2013).

2.2 Biotecnologia

Biotecnologia é o uso ou manipulação de um organismo ou de seus componentes e a moderna biotecnologia é primariamente associada à biologia molecular, clonagem e a engenharia genética. Sendo que esse avanço nas ciências biológicas permitiu isolar e manipular genes que facilitaram o desenvolvimento da biotecnologia industrial (WETHERINGTON, 2010).

De acordo com Morris et al., (2001) A biotecnologia é uma “nova” ciência ou alta tecnologia condutora das indústrias farmacêuticas, médica e agro-alimentar e é aplicada para a produção ou modificação de produtos. Por outro lado, pode-se pensar que esta informação esteja obsoleta, pois já se passaram dezessete anos desde a sua publicação.

Segundo a Organização das indústrias de biotecnologia – BIO (2018), A Biotecnologia explora processos celulares e biomoleculares para desenvolver tecnologias e produtos que ajudam a melhorar a vida e saúde das pessoas.

A Biotecnologia é um campo emergente com grande concentração de conhecimento, é um conjunto de técnicas que possibilitam a realização, pelo homem, de mudanças animais, vegetais e sistemas microbianos, conducentes a produtos e tecnologias úteis. Em si mesma a biotecnologia não pode resolver todos os problemas fundamentais do meio ambiente e do desenvolvimento mas pode contribuir muito para a melhoria deles, como por exemplo: melhor atendimento da saúde, maior segurança alimentar por meio de práticas agrícola sustentáveis, melhor abastecimento de água potável, maior eficiência nos processos de desenvolvimento industrial para transformação de matérias-primas, apoio para métodos sustentáveis de florestamento e reflorestamento, e a desintoxicação dos resíduos perigosos (MATTOS, 2001 apud AGENDA 21, 1995).

A biotecnologia também oferece novas oportunidades de parcerias globais, especialmente entre países ricos em recursos biológicos, que incluem os recursos genéticos, mas carentes da capacitação e dos investimentos necessários para a aplicação desses recursos. A biotecnologia pode contribuir muito para a conservação de tais recursos (MATTOS, 2001 apud AGENDA 21, 1995).

A utilização de métodos biológicos de manipulação de seres vivos, animais, vegetais e microorganismos, na conservação, produção e desenvolvimento de recursos naturais tem sido, desde tempos remotos, uma das formas mais

importantes de intervenção da inteligência humana na otimização de sistemas de informação criados pela própria natureza. A finalidade desta intervenção é aumentar a eficiência do desempenho dos seres vivos, torná-los mais produtivos e alterar suas características originais para incorporar-lhes requisitos que maximizem a capacidade estrutural e funcional de seus princípios (PAVAN et al., 1986).

2.3 Biotécnicas da Reprodução Animal

As biotécnicas da reprodução animal são ferramentas singulares para o avanço tecnológico da pecuária nacional, pois possibilitam a expansão e seleção do material genético adequado para o melhoramento animal (OLIVEIRA et al., 2014).

Os avanços biológicos e tecnológicos, desencadeados pelo desejo de controle dos processos reprodutivos, proporcionaram o desenvolvimento de quatro gerações de tecnologias de reprodução assistida para humanos e animais. A primeira geração inclui: Inseminação artificial, criopreservação de gametas e embriões; na segunda geração encontram-se a superovulação e a transferência de embriões; já a terceira geração compreende a sexagem espermática e embrionária, a recuperação de oócitos e a fertilização in vitro; e a quarta geração envolve a clonagem por transferência nuclear de células embrionárias ou somáticas, a transgenia e a biologia de células-tronco. Sendo que estas tecnologias estão amplamente interligadas umas com as outras (BERTOLINI e BERTOLINI, 2009).

De acordo com Gonçalves et al., (2008) Pode-se considerar inegável a contribuição das biotécnicas reprodutivas ao desenvolvimento técnico-científico e econômico das nações. Destaca ainda que são ferramentas importantes para a compreensão da fisiologia reprodutiva, atuam na multiplicação de animais geneticamente superiores, formação de bancos de germoplasma animal e ainda pode-se esperar a produção de órgãos humanos em animais através dos avanços na transgenia animal (GONÇALVES et al., 2008)

2.3.1 Produção *in vitro* de embriões bovinos

A Produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma técnica de reprodução assistida que consiste na preparação e co-cultivo de gametas em ambiente laboratorial para geração do zigoto, e seu cultivo até o estágio de desenvolvimento embrionário desejado. A técnica está relacionada a uma série de procedimentos integrados, que vão desde o manejo reprodutivo das doadoras e receptoras, punção folicular guiada por ultrassom, procedimentos no laboratório até a transferência dos embriões (RIZOS, 2008).

Inicialmente, a técnica foi desenvolvida para humanos, criada pelos pesquisadores ingleses Robert Edwards e Patrick Steptoe em 1978, resultou no primeiro bebê produzido através de fertilização *in vitro* da história, rendendo aos pesquisadores, o Prêmio Nobel de Medicina no ano de 2010 (BBC, 2012).

A Produção de embriões *in vitro* tem como aplicações principais o melhoramento genético animal, pois aumenta a intensidade e pressão de seleção, quando reduz o intervalo entre gerações (DAYAN, 2001; RENESTO, 2004; VARAGO et al., 2008) e a reprodução assistida de fêmeas de alto valor genético, portadoras de patologias reprodutivas adquiridas (DAYAN, 2001; FABER et al., 2003; RENESTO, 2004). Segundo Hasler, (2014) há ainda, dentre as possibilidades que a PIVE apresenta, a formação de um banco de germoplasma para a conservação e regeneração de espécies animais em perigo de extinção.

Esta técnica tem apresentado muitos avanços e está sendo gradativamente incorporada aos projetos de produção. Com o desenvolvimento do método de punção folicular, tornou-se possível à recuperação de ovócitos de fêmeas vivas para FIV, o que contribuiu para a abertura de novos caminhos para multiplicação de animais de interesse econômico superando os atuais índices da transferência de embrião (TE) clássica, no que diz respeito à produção de bezerro por vaca por ano (DAYAN, 2001).

A PIVE pode ser utilizada em animais jovens, gestantes ou lactantes e com problemas de infertilidade adquiridos (GOODHAND et al., 1999; TANEJA et al., 2000; DAYAN, 2001; RENESTO, 2004).

A utilização de bezerras como doadoras de ovócitos em programas de TE possibilita a oferta constante de embriões F1, oferecendo assim, um grande

potencial para acelerar o ganho genético através da redução do intervalo entre gerações (TANEJA et al., 2000).

Dentre os benefícios da PIVE, ainda pode-se destacar o aprimoramento de técnicas como a clonagem por transferência nuclear, a injeção intra-citoplasmática de espermatozoides (ICSI) e a transgenia animal (WAGTENDONK-DELEEUW et al., 2000).

Em relação à produção *in vivo* de embriões, a PIVE ainda apresenta diversas diferenças, tanto metabólicas quanto morfológicas, e se devem principalmente pelas diferentes condições de cultivo (SÁ et al., 2003). Com isso os embriões obtidos através dessas técnicas têm se tornado mais sensíveis à criopreservação, diminuindo a viabilidade após o descongelamento e a taxa de gestação (HOLM et al., 1998).

De acordo com Rizos et al., (2001) os embriões de PIV possuem citoplasma mais escuro, menor densidade, menor taxa de crescimento e maior sensibilidade térmica. E ainda, nos estágios iniciais, possuem grande quantidade de gotas lipídicas no interior do citoplasma, que são atribuídas ao soro adicionado aos meios de cultivo (TOMINAGA et al., 2000).

Por outro lado, em pesquisas mais recentes Deus et al., (2018) conseguiram, com diferentes protocolos com adição de Soro Fetal Bovino (STF) taxas de viabilidade celular superiores a cinquenta por cento.

Seguindo os parâmetros e as taxas de recuperação oocitária e produção de embriões através da PIVE, desde 2006, vem sendo registrado um crescimento médio de 28% no número de embriões FIV produzidos e uma diminuição de 73% na produção de embriões **in vivo**. Com bases nesses dados acredita-se que o Brasil continuará liderando a produção de embriões *in vitro* e passará a fornecer cada vez mais genética a países interessados (LUSTOSA et al., 2018).

2.3.1.1 Coleta de ovários em abatedouro

Ovários de abatedouro não podem ser utilizados em programas de melhoramento genético, pois, em geral, são oriundos de animais de descarte, cujos históricos sanitário, nutricional e reprodutivo são desconhecidos, sendo, portanto,

destinados apenas às pesquisas por constituírem uma fonte abundante e barata de oócitos (GIBBONS et al., 2008).

Em frigoríficos, os ovários são coletados imediatamente após o abate e evisceração dos animais, identifica-se quanto ao lado em ovário direito (OD) e ovário esquerdo (OE), após isso são armazenados e transportados em solução salina a 0,9% e com temperatura entre 35°C e 37°C (CHACUR, 2006).

Leivas et al., (2004) realizou a coleta de ovários em abatedouro e transportou-os em solução de NaCl a 0,9% acrescida de 50UI/ml de penicilina G-Potássica e 100mg/ml de estreptomicina, utilizando garrafas térmicas com bom isolamento (Figura 1).

Nas pesquisas em que os ovários são provenientes de vacas de abatedouros, estes normalmente são transportados em solução salina a 0,9% de NaCl aquecida a 30-35°C. O tempo transcorrido entre a obtenção dos ovários e o início da colheita varia entre grupos de pesquisa, mas não parece afetar a viabilidade dos ovócitos quando realizado no período de até 3 horas (GONÇALVES et al., 2002).

Figura 1. Modelo de recipiente térmico que pode ser utilizado para transporte de ovários coletados em abatedouro.



Fonte. O autor, 2018.

2.3.1.2 Obtenção de oócitos

Oócitos são células haplóides derivadas das células germinativas primordiais, as quais se desenvolvem antes do nascimento (DEW, 2001). Estas células iniciam a mitose enquanto migram do saco vitelínico embrionário para o local de desenvolvimento gonadal (ovário primitivo), onde são denominadas oogônias (WASSARMAN e ALBERTINI, 1994). Assim que a divisão mitótica se encerra, as oogônias são denominadas oócitos, e tem início a meiose (DEW, 2001).

Os oócitos podem ser obtidos de doadoras vivas, através da aspiração folicular, ou a partir da punção de ovários de fêmeas abatidas em abatedouros. Na década de 80, a aspiração *in vivo* era realizada através de laparotomia, dificultando o procedimento pelas complicações pós-cirúrgicas (incluindo aderências ovarianas), tempo e custo relacionados (CALLESEN et al., 1987).

Outra técnica que permite o aproveitamento de oócitos é a laparoscopia, podendo ser transvaginal ou paralombar (LAMBERT et al., 1983). É um procedimento cirúrgico menos cruel que a laparotomia, e permitiu a recuperação de oócitos em novilhas (LAURINCÍK et al., 1991), e mesmo em bezerras de apenas 3 semanas de idade (ARMSTRONG et al., 1994).

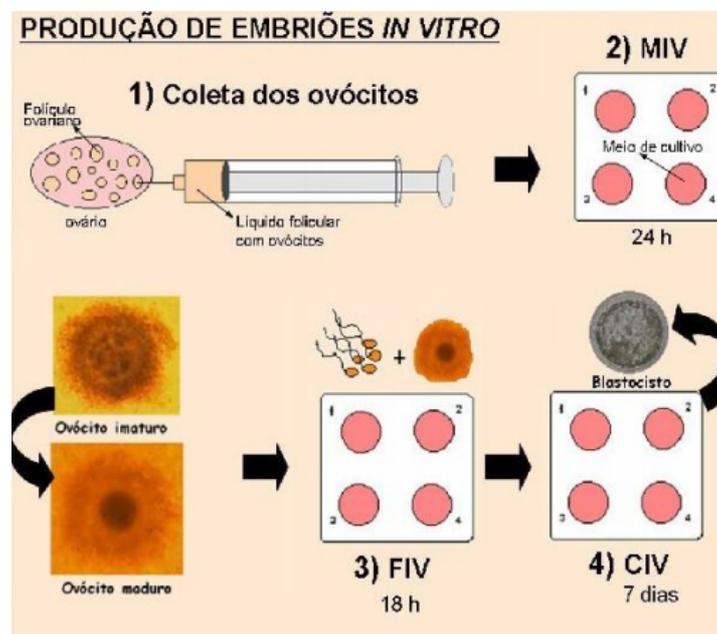
Na década de 80 surgiu a técnica da punção folicular guiada por ultrassonografia, que modernizou e tornou o processo menos invasivo, tanto no que se refere ao número de animais, quanto à frequência de sessões realizadas com o mesmo animal (OLIVEIRA et al., 2014).

Apesar do êxito deste procedimento, a recuperação de oócitos bovinos com uso da ultrassonografia só ganhou grande impulso mais tarde, com uma modificação que tornou o procedimento de mais rápido e prático (DAYAN, 2004). Pieterse et al. (1988) alteraram a técnica descrita para humanos e descreveram a aspiração folicular via transvaginal através da ultrassonografia, que tornou viável o aproveitamento de oócitos bovinos, sem as limitações dos procedimentos existentes até então. Após avaliações, a técnica mostrou-se simples e inócua, viabilizando a recuperação, maturação e fecundação de oócitos imaturos, podendo ser repetida várias vezes em um mesmo animal (KRUIP et al., 1991), inclusive com um aumento no número de folículos após várias semanas de aspirações foliculares (WALTON, 1995).

Os oócitos destinados à PIV podem ser obtidos do oviduto, logo após a ovulação, sendo que neste caso, o processo de maturação oocitária já se iniciou *in vivo*, ou de folículos pré-ovulatórios, imaturos e por vezes atrésicos, havendo necessidade de ser realizada a maturação oocitária *in vitro* (WANI, 2002).

Quando se trabalha com ovários oriundos de abatedouro, os oócitos podem ser obtidos por meio da técnica do fatiamento dos ovários (*slicing*) ou do método da aspiração folicular com agulha acoplada à seringa (Figura 1) ou bomba a vácuo (BERNARDI, 2005). De acordo com Wani et al. (2000), a técnica de *slicing* possibilita o acesso a folículos localizados profundamente dentro do córtex do ovário, resultando na recuperação de maior quantidade de oócitos do que o método da aspiração folicular com agulha acoplada à seringa, no qual ainda há maior possibilidade de perdas.

Figura 2. Esquema da PIV, com aspiração folicular com agulha acoplada à seringa.



Fonte: Adaptado de Vaquero et al., 2015.

No entanto, o *slicing* apresenta a desvantagem de ser uma técnica demorada além de gerar muitos debris, os quais dificultam a posterior identificação das

estruturas, havendo necessidade de maior treinamento do indivíduo que efetua a técnica (WANI, 2002).

Logo após a coleta, os oócitos são analisados sob estereomicroscópio e classificados em diferentes graus, de acordo com a presença das células do *cumulus* e características do ooplasma (SHIRAZI et al., 2005), sendo selecionados para a posterior maturação *in vitro*. A presença das células do *cumulus*, bem como sua íntima associação com oócito por meio das junções GAP comunicantes (GJCs), é fundamental para aquisição de competência oocitária para suportar os posteriores eventos da fertilização e do desenvolvimento embrionário (SHIMADA E TERADA, 2002).

Através da transferência de nutrientes, íons, nucleotídeos e substâncias de baixo peso molecular, as células do *cumulus* garantem a nutrição e a conexão do oócito com o meio externo, modulam os efeitos dos hormônios e fatores de crescimento e ainda participam da regulação da maturação oocitária (SOOM et al., 2002).

A comunicação entre o oócito e as células do *cumulus* não é unidirecional, mas sim bidirecional, de modo que os fatores solúveis sintetizados pelos oócitos podem afetar diversas funções das células da granulosa, como: a proliferação das células da granulosa, a secreção de inibinas, a expressão de receptores de LH, a expansão das células do *cumulus* e a função esteroidogênica das células da granulosa (SHIRAZI et al., 2007).

Em relação à aspiração folicular em ovários coletados em abatedouro, os ovários são coletados e transportados ao laboratório, onde folículos entre 2 a 8 mm são aspirados com auxílio de agulha acoplada a seringa ou bomba de vácuo. Este método é utilizado, principalmente, para experimentos científicos e controle de qualidade dos sistemas de PIVE em laboratórios (AHUMADA et al., 2013).

2.3.1.3 Maturação *in vitro* (MIV)

Em bovinos, o primeiro bezerro nascido de PIV a partir de um ovócito, cuja maturação foi realizada *in vitro*, nasceu em 1981. A maturação oocitária é essencial no processo de PIV pois é onde o ovócito adquire capacidade para ser

posteriormente fecundado. Assim, a maturação dos ovócitos depende da eficiência do método de colheita e principalmente do método de maturação *in vitro*, pois somente os ovócitos maturados nuclear e citoplasmaticamente poderão ser fecundados (BRACKET et al., 1982).

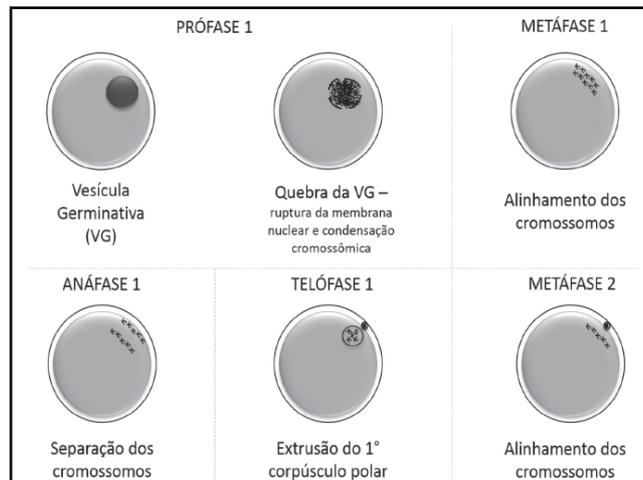
Esta etapa, que ocorre em um período de 22 a 24 horas, tem recebido a atenção de pesquisadores que visam melhorar os resultados da produção *in vitro* de embriões (PARRISH, 2014), dada a sua importância, visto que envolve uma série de transformações nucleares, citoplasmáticas e moleculares que tornam o gameta feminino apto a ser fecundado (SMITZ et al., 2004).

De acordo com Thompson et al., (2000) entre 18 a 22 horas são necessárias para que ocorra a maturação nuclear em bovinos, passando do estágio de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica para o estágio de metáfase II.

Essa maturação é caracterizada pela transição do estágio de vesícula germinativa (VG) ao de metáfase II (MII), passando por mudanças que preparam o oócito para ser fecundado e estar apto para se desenvolver como embrião, sendo que estas alterações ocorrem não somente no núcleo, mas também no citoplasma, de maneira independente e modo coordenado para garantir a competência no desenvolvimento celular (RODRIGUES, 2003). No início da maturação nuclear ocorre condensação gradual da cromatina, desaparecimento do nucléolo e desintegração da membrana celular, processo denominado quebra de vesícula germinativa (KUBELKA et al., 1998).

Posteriormente, os cromossomos se encontram mais condensados e dispostos no plano central do eixo metafásico, caracterizando o estágio de metáfase I (MI), evoluindo para MII quando ocorre compactação dos cromossomos e extrusão do primeiro corpúsculo polar (HEWITT & ENGLAND, 1997). Estas fases estão representadas na Figura 3.

Figura 3. Etapas da maturação nuclear.



Fonte. Oliveira et al., (2014, p. 33).

Para que todos os eventos mostrados na figura acima ocorram *in vitro*, é necessário que os meios utilizados durante este período mimetizem as condições encontradas durante o processo de maturação *in vivo* (SANGILD, 2000).

Existem vários métodos que já foram testados e que podem ser utilizados durante a MIV em bovinos, sendo que a grande maioria dos laboratórios tem optado pela suplementação do meio de maturação com soro fetal bovino (SFB) e gonadotrofinas (FSH, LH e estradiol) em condições controladas de atmosfera gasosa e temperatura (RODRIGUES et al., 2010). Sabe-se que o potencial de desenvolvimento dos oócitos pós-maturação pode ser afetado por uma série de fatores, como osmolaridade, temperatura, pH, tensão de CO₂ e O₂, e uso do soro e células somáticas (SANGILD, 2000). Após o tempo de incubação da MIV, os oócitos completam a maturação com a extrusão do primeiro corpúsculo polar, estando assim, aptos à fecundação (AVELINO et al., 2002).

Os eventos moleculares e bioquímicos que ocorrem no oócito até atingir a maturação devem ser estritamente controlados para que um gameta feminino viável esteja disponível para fertilização e desenvolvimento embrionário subsequente (WRENZYCKI e STINSHOFF, 2013).

2.3.1.4 Fecundação *in vitro* (FIV)

A fecundação *in vitro* ocorre através da incubação de oócitos maduros com espermatozoides capacitados, em meio de fecundação. Neste momento, ocorre a combinação do material genético dos gametas e a formação do zigoto. Para adquirir competência para fecundação, o espermatozoide precisa sofrer capacitação. Este processo ocorre pela remoção de fatores “decapacitantes” presentes no fluido seminal (OLIVEIRA et al., 2014).

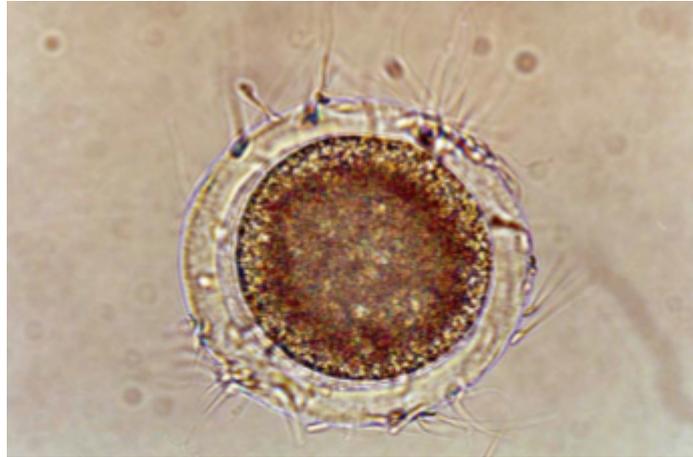
No processo de fertilização *in vitro*, são usados espermatozoides de palhetas de sêmen congelado e o sistema baseado na separação pelo gradiente Percoll tem sido o método mais comum para a obtenção da fração espermática viva após o descongelamento (GALLI, 1996).

In vivo, o processo acontece durante a passagem do espermatozoide pelo trato genital feminino, e envolve a desestabilização da membrana plasmática e hiperativação espermática. *In vitro*, o processo de capacitação é desencadeado por glicosaminoglicanas, como a heparina, que são adicionadas aos meios de fecundação (VARAGO et al., 2008).

Ao entrar em contato com o oócito, na presença de cálcio extracelular, o espermatozoide capacitado se liga aos receptores presentes na zona pelúcida e sofre a reação acrossômica, determinada pela fusão das membranas plasmática e acrossomal. Assim, o conteúdo acrossômico é liberado, e somado à motilidade progressiva espermática, auxilia a penetração do espermatozoide e ligação aos receptores. Após penetrar o espaço perivitelino, a membrana plasmática do espermatozoide se funde à membrana vitelina, havendo liberação de cálcio no interior do oócito. Este influxo de cálcio promove a liberação do conteúdo dos grânulos corticais e reação zonal, que determina o enrijecimento da zona pelúcida e bloqueio à poliespermia (VARAGO et al., 2008).

Na fertilização, o espermatozoide capacitado liga-se à zona pelúcida do ovócito, sofre a reação acrossomal e hiperativação (Figura 4). Após o início da fusão, o espermatozoide torna-se imóvel e sua membrana plasmática é incorporada à membrana do ovócito, ativando as fosfolipases componentes. A hiperpolarização da membrana é o primeiro sinal da ligação do espermatozoide com o ovo, sendo seguida imediatamente da liberação de cálcio dos estoques internos localizados no retículo endoplasmático do ovócito (GÓMEZ et al., 1998).

Figura 4. Ovócito bovino na FIV com espermatozoides aderidos.



Fonte: Adaptado de Mattos, 2001.

Há ainda a necessidade do influxo de Ca^{2+} do meio se este for disponível, e a alta concentração deste íon promove então a ativação de enzimas e segundos mensageiros, responsáveis pelo estímulo de finalização da divisão celular do ovócito e ativação da metáfase II (EDWARDS, 1995).

Na insuficiência de Ca^{2+} no meio, a ativação não pode ser continuada. A liberação de grânulos corticais pelo ovócito é um dos mecanismos induzidos pela alta concentração de cálcio, e tem função de bloqueio à polispermia. A organização da cromatina e fusão dos pró-núcleos masculino e feminino, leva um tempo variável entre as espécies, bem como o início das clivagens do núcleo então diploide (GÓMEZ et al., 1998).

Embora outros sistemas possam ser usados, como o *swim-up*, (método que seleciona os espermatozoides mais ativos) para se maximizar a capacidade fecundante de um sêmen com o mínimo de polispermia possível, testes com diferentes concentrações espermáticas podem ser feitos, fixando-se os oócitos após a incubação com os espermatozoides e analisando-se em microscópio a configuração da cromatina (HOSHI, 2003). O período de incubação dos oócitos com os espermatozoides varia entre 12 a 20 horas (SANGILD et al., 2000).

2.3.1.5 Cultivo *in vitro* (CIV)

O cultivo *in vitro* corresponde à etapa de desenvolvimento do oócito fertilizado até o estágio de blastocisto (SANGILD et al., 2000). É durante este período de desenvolvimento pré-implantação que ocorrem eventos como ativação do genoma embrionário, processo de divisão celular, compactação dos blastômeros no estágio de mórula e início da diferenciação embrionária com a formação da blastocele (HOSHI, 2003).

O período de desenvolvimento embrionário pré-implantação é marcado por importantes eventos, como clivagem, diferenciação do trofoblasto e embrioblasto, formação e expansão da blastocele e rompimento da zona pelúcida (LONERGAN et al., 1999). Esses fenômenos podem ser afetados de muitas formas no cultivo *in vitro*, sendo o ponto crítico do desenvolvimento a ativação do genoma embrionário, que se dá por volta do estágio de 8 - 16 células (MEMILI e FIRST, 2000).

As condições de cultivo *in vitro* são consideradas muito importantes para que bons índices de produção de embriões sejam alcançados, razão pela qual, inúmeras pesquisas têm sido realizadas visando avaliar o efeito que diferentes fatores, intrínsecos e extrínsecos, possam exercer sobre o metabolismo e capacidade de desenvolvimento destes embriões, como por exemplo, a composição dos meios de cultivo e condições de temperatura e atmosfera gasosa, a adição de aminoácidos, vitaminas, macromoléculas e fatores de crescimento, assim como o uso de SFB (NAGAI, 2001).

2.3.1.6 Classificação dos embriões

O desenvolvimento embrionário *in vitro* é avaliado no 6º dia de cultivo visualizando-se a compactação dos blastômeros e início da formação da blastocele, sendo que no 7º dia é realizada a seleção e avaliação final dos embriões para a transferência a fresco ou para o congelamento (THOMPSON, 2000).

A classificação morfológica é uma ferramenta indispensável para a seleção dos embriões aptos à transferência e criopreservação. Estruturas que se apresentam viáveis, aptas ao desenvolvimento pós-implantacional e com maior

tolerância ao congelamento normalmente correspondem a estruturas bem desenvolvidas morfológicamente (OLIVEIRA et al., 2014). A descrição dos diferentes escores de classificação da qualidade dos embriões pode ser observada na Tabela 1.

Leal, (2008) classificou os oócitos em graus 1, 2, 3, desnudos e expandidos, de acordo com o número de camadas de células do *cumulus* e o aspecto do citoplasma do ovócito. Sendo os de grau 1 complexo *cumulus oophorus* compacto e uniforme, com três ou mais camadas de células e citoplasma homogêneo, até os Desnudos, sem células ao redor do ovócito e Expandidos, com as células do *cumulus oophorus* expandidas.

Tabela 1. Classificação dos embriões quanto à qualidade

Código	Classificação	Descrição
1	Excelente ou bom	Massa embrionária simétrica e esférica, com blastômeros uniformes em tamanho, cor e densidade. Desenvolvimento adequado. Ao menos 85% do material celular viável. Zona pelúcida lisa.
2	Regular	Irregularidades moderadas na forma ou tamanho da massa embrionária, ou na cor e densidade das células. Ao menos 50% do material celular viável.
3	Pobre	Irregularidades maiores na forma e na massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 25% do material celular viável.
4	Morto ou degenerado	Embriões não viáveis ou com desenvolvimento parado.

Fonte. Adaptado do manual da Embrapa: Biotécnicas da reprodução em bovinos. 2014.

2.4 Criopreservação de embriões

Criopreservação envolve o armazenamento de tecidos biológicos vivos a baixas temperaturas, sendo, um procedimento amplamente utilizado para conservação de linhagens celulares, espermatozoides e fragmentos de tecidos. (SANTIN et al., 2009).

Uma maneira de solucionar problemas relacionados com o armazenamento de embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro* não transferidos é a utilização de técnicas de criopreservação de embriões. O domínio dessas técnicas torna viável a formação de bancos de embriões, promovendo a oportunidade de se preservar material genético fundamental no melhoramento genético dos plantéis, podendo ser efetuado com maior rapidez e eficiência, mesmo em pequenas populações de animais, com a possibilidade de disseminação do material genético de animais zootecnicamente superiores (SIQUEIRA-PYLES et al., 2003).

Consiste em uma biotécnica que torna possível o controle racional das atividades da biologia da reprodução. A parada do desenvolvimento embrionário no estágio de blastocisto permite a programação de diversas etapas subsequentes, otimizando o destino destes embriões. Khurana e Niemann, (2000) ressaltaram que o manejo das receptoras seria o mais interessante, mas afirmam a sua inviabilidade, visto que, a estimativa do número de blastocistos produzidos é sempre muito imprecisa.

A preservação das estruturas gaméticas através do resfriamento ou congelação, denominada de criopreservação, foi um dos eventos que mais contribuiu para a difusão do ganho e melhoramento genético, e para o estudo aprofundado das diferentes raças e espécies bovinas. A partir do primeiro relato do nascimento de animais normais de ovócitos criopreservados de camundongos, diversas outras espécies começaram a ser testadas (WHITTINGHAM et al., 1972). No entanto, percebeu-se que o abaixamento da temperatura, em qualquer grau, afeta de forma muito mais drástica o ovócito bovino, em relação ao de outras espécies de mamíferos (ARAV et al., 1996).

Embriões bovinos são estruturas com apenas cerca de 90 células, envoltas pela zona pelúcida, o que torna o processo de criopreservação bastante complexo, pois a perda ou injúria destas células pode ser irreparável, principalmente se atingir algum tipo celular específico, como a massa celular interna ou trofotoderma (OLIVEIRA et al., 2014).

Ressalta-se ainda que, embriões PIVE são menos resistentes à criopreservação do que os *in vivo*, o que tem sido associado às diferenças nas características físicas e morfológicas desses embriões (ABE et al., 2002). E segundo Crosier et al., (2001) é possível mencionar que dentre essas diferenças destaca-se,

maior quantidade de vacúolos, reduzida expressão de comunicações intercelulares, compactação menos pronunciada, disco embrionário geralmente de menor tamanho e com menos células, menor quantidade de células totais e zona pelúcida mais frágil. Além disso, possuem um grande acúmulo intracelular de lipídeos e um decréscimo na densidade de mitocôndrias maduras quando comparados com embriões *in vivo* (FARIN et al., 2004).

De acordo com Dode et al., (2013) dois métodos são utilizados para a criopreservação de embriões: congelamento lento ou clássico e vitrificação. Sendo que o congelamento clássico, método mais utilizado, utiliza baixas quantidades de crioprotetores, contudo permite a formação de cristais de gelo (efeito solução), que, em maior ou menor escala, resultam em lesões às membranas e organelas. Segundo o mesmo autor, neste processo, controla-se a queda da temperatura até que se atinja - 32°C e após isso, mergulham-se as palhetas no nitrogênio líquido.

Um dos mais importantes princípios da criopreservação reside na necessidade de se remover o máximo possível de água das células antes de se proceder ao congelamento, se esta desidratação não ocorrer, grandes cristais de gelo se formarão lesando severamente a estrutura intracelular. No entanto, a remoção demasiada de água das células também pode ser deletéria (SEIDEL Jr., 1986).

Em relação ao processo de vitrificação, se utilizam altas concentrações de crioprotetores, os quais formam uma solução viscosa que, durante o resfriamento, fazem com que a água da célula se solidifique em estado vítreo, sem a formação de cristais de gelo (VAJTA e NAGY 2006). Entretanto, a toxicidade dos crioprotetores é tanta, que as células só podem ser expostas a essa solução por um período muito curto de tempo e/ou um volume mínimo de solução (VAJTA et al., 1998). Como forma de enfrentar esse problema, a maioria dos protocolos utilizados atualmente tem visado a diminuição na concentração e no volume dos crioprotetores utilizados e o aumento na curva de resfriamento (DODE et al., 2013).

A técnica Open Pulled Straw (OPS) provocou um grande impacto no uso da vitrificação. A maioria dos autores relata resultados positivos com a vitrificação de embriões bovinos PIV (VAJTA et al., 1998).

Nesta técnica, os tampões de algodão das palhetas francesas de inseminação de 0,25mL são removidos e estas são amolecidas por aquecimento em sua região central e esticadas manualmente até que o diâmetro interno e a

espessura da parede diminuem para aproximadamente metade do tamanho original. As palhetas são subseqüentemente resfriadas em ar e cortadas em duas na extremidade estreita (VAJTA et al., 1998).

O envasamento dos embriões é realizado utilizando o efeito capilar simples. Cerca de 1 a 2 μ L do meio de vitrificação contendo o embrião é introduzido na extremidade estreita da palheta, a qual é imediatamente submersa no nitrogênio líquido. A coluna líquida solidifica-se imediatamente, sem que haja a dispersão da solução, o que é comum quando são utilizadas palhetas de tamanho original (VAJTA et al., 1998).

2.5 Transferência de Embriões

A transferência de embriões (TE) é uma biotécnica mundialmente difundida, com mais de 500.000 embriões bovinos sendo produzidos e transferidos a cada ano (HASLER, 2003). O Brasil tornou-se referência na área da reprodução animal devido aos avanços e à vasta aplicação dessa técnica, havendo um aumento significativo no número de TEs realizadas no país (VIANA e CAMARGO, 2007).

A TE consiste na estimulação hormonal dos ovários de um animal doador, para induzir o desenvolvimento e a maturação de vários folículos simultaneamente. De seis a oito dias após a fecundação natural ou a inseminação artificial, os embriões são coletados através de uma lavagem uterina e transferidos para outros animais receptores, que levarão a gestação a termo (BEM et al., 1996). O termo transferência de embriões constitui de um leque de várias técnicas que se iniciam com a seleção dos animais até a inovulação. Inovulação é um termo técnico, e consiste na deposição do embrião de um animal doador para o útero de um outro receptor, quer seja pelo método cirúrgico ou transcervical (BEM et al., 1994).

Esta técnica é utilizada em diversos tipos de mamíferos, sendo que seus melhores resultados são com animais domesticados (bovinos, caprinos e suínos) (HAFEZ, 1995), proporcionando um melhor aproveitamento de matrizes de elevado mérito genético, podendo aumentar, em média, 10 vezes o número de crias por ano (WAGTENDONK-DELEEW et al., 2000).

Nos rebanhos bovinos, quando se alia a TE com as técnicas de genética quantitativa, possibilita-se o aumento da intensidade de seleção, a redução no

intervalo de gerações de fêmeas e conseqüentemente, obtém-se maiores ganhos genéticos (BILHASI, 2010).

Na TE os esforços se concentram no desenvolvimento de novos protocolos de indução da ovulação múltipla a partir de uma nova geração de hormônios (mais purificados) e informações básicas sobre a foliculogênese (CACCIA, et al., 2000).

A TE apresenta algumas restrições. Relatos de cistos ovarianos, endometrites e lesões iatrogênicas foram observados em grande número de doadoras (BAK et al., 1989). Kruip et al. (1991) observaram que o número de estruturas recuperadas nem sempre justificava a realização da técnica. Meintjes et al. (1995) relataram que a contínua interrupção do ciclo estral e as terapias gonadotróficas poderiam comprometer a fertilidade da doadora e Bols et al. (1997) ressaltaram a variabilidade de respostas ao estímulo gonadotrófico, além da regular colheita de estruturas não fecundadas.

Outro aspecto é que a colheita de embriões mostra-se inviável em algumas situações de infertilidade extra-ovariana, como hidrosalpinge bilateral (BOLS et al., 1997) e nas obstruções uterinas (SENEDA et al., 2000). Uma limitação adicional diz respeito à difícil aplicabilidade da TE em programas de biotecnologia, como a clonagem, que requer embriões em estádios iniciais de desenvolvimento (LAMBERT et al., 1986).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a revisão de literatura realizada, pode-se perceber que a produção *in vitro* de embriões, juntamente com as demais biotécnicas da reprodução, foi responsável pelo grande desenvolvimento que a pecuária brasileira obteve nos últimos anos. A técnica envolve várias etapas e o sucesso nos resultados depende do êxito de cada uma dessas etapas do processo.

A produção *in vitro* de embriões a partir de ovários coletados em frigorífico serve para o aperfeiçoamento da técnica e para fins de pesquisa, mas a coleta de oócitos em animais vivos é capaz de reduzir o intervalo de gerações entre as espécies, uma vez que possibilita inclusive, a reprodução de animais com meses de idade.

Dentre os benefícios da técnica podem-se ressaltar a redução do intervalo entre gerações, a reprodução de animais em situações problemáticas, o aumento do número de produtos por fêmea e a reprodução de animais mortos e até mesmo considerados extintos.

Ainda existe um longo caminho a ser percorrido no tocante ao aperfeiçoamento da técnica, mas os esforços realizados até então têm garantido bons resultados. Além de serem responsáveis pelo incremento financeiro à cadeia animal, as biotécnicas da reprodução podem ser consideradas como o futuro de muitas espécies.

4 REFERÊNCIAS

- ABE H, YAMASHITA S, SATOH T, HOSHI H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum free or serum-containing media. **Mol Reprod Dev**, v.61, p.57-66, 2002.
- ABIEC, **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne**. Perfil da pecuária no Brasil – Relatório anual 2016. Disponível em: <<http://www.assessoriaagropecuaria.com.br/anexo/88>>. Acesso em: 01 Jun. 2018.
- AHUMADA, C. J.; SALVADOR, I.; CEBRIAN-SERRANO, A.; LOPERA, R.; SILVESTRE, M. A. Effect of supplementation of different growth factors in embryo culture medium with a small number of bovine embryos on in vitro embryo development and quality. **Animal Science**, v. 7, p. 455-462, 2013.
- ARAV, A; ZERON, Y.; LESLIE, S.; BEHBOODI, E.; ANDERSON, G.B.; CROWE, J.H. Phase Transition Temperature and Chilling Sensitivity of Bovine Oocytes. **Animal Science**, Agriculture Research Organization (ARO), POB 6 Bet Dagan, 50250 Israel. **Animal Science**. Section of Molecular and Cellular Biology, University of California, Davis, California. 1996.
- ARMSTRONG, D. T. et al. Gonadotropins stimulations regimens for follicular aspiration and in vitro embryo productions from calf oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 42, p. 1227-1236, 1994.
- AVELINO, K.B., VANTINI, E., SENEDA, M.M., et al. In vitro production of embryos of cows with acquired infertility. **Theriogenology**, v.57, p.656, 2002.
- BARBOSA, FS., org. **Tópicos em malacologia médica** [online]. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1995. 314 p. ISBN 85-85676-13-2. 1995.
- BEM, A. R. A fecundação in vitro na espécie bovina no Brasil – Abordagem histórica. **Arquivo Faculdade de Veterinária do Rio Grande do Sul**. Vol. 24: 135-137, 1996.
- BEM, A. R. de; FREITAS, V. C.; SOUSA, R. V.; RUMPF, R.; EGITO, A. A. RUMPF, L. Criopreservação de ovócitos imaturos de bovinos utilizando como crioprotetor o propanediol. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões**: p. 94, 1992.
- BERNARDI ML. Produção in vitro de embriões ovinos. **Acta Sci Vet**, v.33, p.1-16, 2005
- BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L.R. Advances in reproductive technologies in cattle from artificial insemination to cloning. **Rev. Med. Vet. Zoot.** v.56, p. 184-94, 2009.
- BILHASSI T.B.; NETO F.R.A.; DIAZ I.D.P. et al. Efeito da inclusão de animais provindos de transferência de embriões na avaliação genética de medidas ponderais na raça Simental. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 8., 2010. Maringá- PR. **Anais...** Maringá - PR, (2010).

BAK, A.; GREVE, T.; SCHMIDT, M. Effect of super ovulation on reproduction. **Theriogenology**, Stoneham, v.31, p. 169, 1989. (Abstract).

BOLS PEJ, YSEBAERT MT, SOOM AV, KRUIF AD, VAN SOOM A, DE KRUIF A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**, v.47, p.1221-1236, 1997.

BOLS, P.E.J.; VAN SOOM A.; YSEBAERT, M.T.; VANDENHEEDE, J.M.M.; KRUIF, A. Effects of aspiration cavuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.45, p.1001-1014, 1996.

BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONARVICK, W.J.; E VANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biol. Reprod.**, v.27, p.147-158, 1982.

CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H. et al. Effect of pretreatment with eCG on superovulatory response in CIDRB-treated beef cattle. **Theriogenology**, v.53, p.495, (2000).

CALLESEN, H.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v.27, p.217, 1987. (Abstract).

CHACUR, M.G.M., VALENTIM, N.C., MARTINEZ, A.I.S., TOSTES, R.A., KRONKA, S.N. Morfometria de ovários de fêmeas zebu *Bos taurus indicus* coletados em matadouro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 65-70, 2006.

CROCOMO, L. F. Peculiaridades da coleta de oócitos para produção in vitro de embriões ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 1, p. 25-31, 2012.

CROSIER AE, FARIN PW, DYKSTRA MJ, ALEXANDER JE, FARIN CE. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biol Reprod**, v.64, p.1375-1385, 2001.

CURCIO, A.G.; MICÁN, G.M.; PAES DE CARVALHO, C.S. et al. Efeito da adição de cafeína e da redução do volume de meio de fertilização in vitro sobre a taxa de clivagem e taxa de blastocisto de embriões bovinos. **II Congresso Fluminense de Iniciação Científica E Tecnológica, 15º Encontro De IC da UENF, 7º circuito de IC do IFF, 3º jornada de IC da UFF, (2011).**

DA SILVA, J.S.; BORGES, L.S.; MARTINS, L.E.L.L.; LIMA, L.A.; BARBOSA, Y.G.S; SILVA, N.A.; PAIVA BRITO T.K. Aspectos comerciais da transferência de embriões e fertilização in vitro em bovinos – revisão. **Nutritime Revista Eletrônica**. Vol. 12, Nº 05, set/out de 2015 ISSN: 1983-9006. 2015.

DAYAN, A. **Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação *in vitro***. Dissertação – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Botucatu. UNESP. 2001.

DODE, M.A.N; LEME, L. O.; SPRÍCIGO, J.F.W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.145-150, abr./jun. 2013

EDWARDS, R.G. Cell cycle factors in the human oocyte and intracytoplasmic injection of spermatozoa. **Reprod. Fertil. Dev.** v.7, n.2, p.143-153, 1995.

FABER, D. C.; MOLINA, J. A.; OHLRICH, C. L.; VANDER ZWAAG, D. F.; FERRÉ, L. B. Commercialization of animal biotechnology. **Theriogenology**, v. 59, p. 125-138, 2003.

FARIN CE, FARIN PW, PIEDRAHITA JA. Development of fetuses from *in vitro*-produced and cloned bovine embryos. **J Anim Sci**, v.82, E-Suppl, p.E53-E62, 2004

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.42, p.371-379, 1996.

GIBBONS A, BONNET FP, CUETO MI, SALAMONE D, CATALA M. Colheita de oócitos guiada por laparoscopia em caprinos e ovinos. **Acta Sci Vet**, v.36, supl. 2, p.s223-230, 2008.

GOMÉZ, M.C., CATT, J.W., EVANS, G. Sheep oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Reprod. Fertil. Dev.** v.10, n. , p.197205, 1998

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**, 2002.

GOODHAND, K. L. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following fsh treatment. **Theriogenology**, Stoneham, v.51, p.951-961, 1999.

HAFEZ, E. S, E. **Reprodução Animal. 6ª edição**R. São Paulo: Editora Manole. 1995

HASLER, J.F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.79, n. 3-4, p.245–264, (2003)

HASLER, J. F. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. **Theriogenology**, v. 81, p. 152-169, 2014.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C. The effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitch. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**. v.51, p. 83-91, 1997.

HOLM, P.; CALLESEN, H. In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.38, p.579-594, (1998).

HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, p.675-685, 2003.

KHURANA N.K., NIEMANN H. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo. **Theriogenology**, v.54, p.313-326, 2000.

KRUIP, T. A. et al. A new method for bovine embryo production: a potential alternative to superovulation. **Veterinary Record**, London, v.128, p. 208-210, 1991.

KUBELKA, M. et al. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. **Gamete Research**, v. 19, p. 423-431, 1998.

LAMBERT, R. D. et al. Endoscopy in cattle by the paralumbar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration. **Theriogenology**, Stoneham, v.20, n.2, p.149-161, 1983.

LAMBERT, R. D. et al. In vitro fertilization of bovine oocytes matured in vivo and collected at laparoscopy. **Theriogenology**, Stoneham, v.25, n.1, p.117-133, 1986.

LAURINCÍK, J. et al. Timing of laparoscopies aspiration of preovulatory oocytes in heifers. **Theriogenology**, Stoneham, v.35, n.2, p.415-423, 1991.

LEAL, L. S. Estudo morfofisiométrico de ovários e maturação ovocitária in vitro em bubalinos e bovinos nas diferentes fases da atividade reprodutiva. 2008. 178 f. Tese (doutorado) - **Universidade Estadual Paulista**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2008.

LEIVAS, G.F.; BRUM DOS SANTOS, D.; MEZZALIRA, A.; PILLA CÁCERES, L. F.; BERNARDI, M.L; RUBIN BATISTELLA, M. I.; SILVA MONDINO, C.A. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa. **Ciência Rural**, vol. 34, núm. 1, janeiro - fevereiro, pp. 219 – 224, 2004.

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.**, v. 117, p. 159-167, 1999.

MATTOS, L.M. Biotecnologias em reprodução assistida na preservação de animais silvestres em extinção. **Monografia apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde do Centro Universitário de Brasília**. Centro Universitário de Brasília - Faculdade de Ciências da Saúde Licenciatura em Ciências Biológicas. Brasília – DF. 2001.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO. Diretrizes Curriculares Nacionais para o curso de graduação em Zootecnia. **Resolução CNE/CES nº 4 de 02/02/2006** - Norma Federal. Publicado no DO em 03 fev 2006.

MEINTJES, M.; BELLOW, M.S.; BROUSSARD, J.R.; PAUL J.B.; GODKE, R.A. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef for in vitro fertilization. **J. Anim. Sci.**, v. 73, p. 967-974, 1995.

MEMILI, E.; FIRST, N. L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**, v. 8, p. 87-96, 2000.

MONTANARI, T. **Embriologia: Texto, Atlas e Roteiro de Aulas Práticas**. Porto Alegre – RS. Edição do Autor. UFRGS. Porto Alegre. 2013.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N.; TORCHIA, M.G. The developing human: Clinically oriented embryology. **Embriologia Clínica 8ª Edição**. Rio de Janeiro. Elsevier. 2008.

MORRIS, DG; DISKIN, M.G.; SREENAM, J.M. Biotechnology in cattle reproduction. **Beef Production**, series nº 39, 2001.

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

OLIVEIRA, C.S.; SERAPIÃO, R.V.; QUINTÃO, C.C.R. Biotécnicas da reprodução em bovinos: minicursos ministrados durante o 3º Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em Bovinos” no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica – Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, 52 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 175). 2014.

PARRISH, J. J. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, v. 81, p. 67-73, 2014.

PAVAN, C., BARROS, M. B. de, et al. **A experiência Brasileira em Biotecnologia. Biotecnologia e Desenvolvimento Nacional**. São Paulo: Secretaria da indústria, comércio e tecnologia. 1986. 328p.

PIETERSE, M. C. et al. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, Stoneham, v.30, n.4, p.751-762, 1988.

RENESTO, A. ASSOCIAÇÃO DAS BIOTÉCNICAS: ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRA-SONOGRRAFIA E SUPEROVULAÇÃO NA PRODUÇÃO IN VITRO E IN VIVO DE EMBRIÕES BOVINOS. Dissertação - **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP**. Jaboticabal. 2004

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

RODRIGUES, B.A. Maturação e fecundação in vitro de ovócitos de caninos domésticos (canis familiares). 119 f. Tese (Doutorado em Reprodução == Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P. et al. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. **Theriogenology**, v.56, p.1-16, (2001).

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 43, Suppl. 4, p. 44-50, 2008.

SÁ, W.F et al. Desenvolvimento pós-fecundação de oócitos bovinos pré-maturados em fluido folicular. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.55, p.287-292, (2003).

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

SANTIN, T. R.; BLUME, H.; MONDADORI, R. G. Criopreservação de embriões – metodologias de vitrificação. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, p. 561, 2009.

SEIDEL Jr., G.E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: **TECHNIQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS: SHORT COURSE PROCEEDINGS**, 6, 1986, Fort Collins. Proceedings...Fort Collins: USA, 1986.

SENEDA, M.M; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; PUELKER, R.Z.; OLIVEIRA J.A. Obtenção de embriões bovinos em um caso de obstrução uterina. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.28, n.1, p.331, 2000.

SENEDA, M.M., ESPER, C.R., GARCIA, J.M., OLIVEIRA, J.A., VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 67, p. 37-43, 2001.

SHIMADA, M.; TERADA, T. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. **Mol Hum Reprod**, vol.8, p.612-618, 2002.

SHIRAZI, A.; SHAMS-ESFANDABADI, N.; HOSSEINE, S.M. A comparison of two recovery methods of ovine oocytes for in vitro maturation. **Small Rumin Res**, v.58, p.283-286, 2005.

SHIRAZI, A.; SHAMS-ESFANDABADI, N.; HOSSEINI S.M.; KARIMI, I. The presence of cumulus cells on nuclear maturation of sheep oocytes during in vitro maturation. **Small Rumin Res**, v.68, p.291-295, 2007.

SIQUEIRA-PYLES, E.S.C. Criopreservação de embriões bovinos. Monografia apresentada à disciplina “Seminários II” do programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, nível doutorado, área de concentração em Reprodução Animal

da **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP**, Campus de Botucatu, 2003.

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**, v. 3, p. 5-12, 2004.

SOOM AV, TANGHE S, PAUW ID, MAES D, KRUIF A. Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. **Reprod Dom Anim**, v.37, p.144-151, 2002.

TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; VELDE, V. Development competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal, variation and repeated gonadotrooin stimulation. **Bio. Reprod.**, Champaign, v. 62, p. 206-213, (2000).

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

TOMINAGA, K.; HAMADA, Y.; YABUUE, T. et al. Effect of linoleic acid-albumin on post-thaw survival of in vitro-produced bovine embryos at the 16-cell stage. **Vet. Med. Sci**, v.62, p.465-467, (2000).

VAJTA G., HOLM P., KUWAYAMA M., BOOTH P.J., JACOBSEN H., GREVE T., CALLESEN H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.51, p.53-58, 1998.

VAJTA G, NAGY Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reprod Biomed Online**, v.12, p.779-796, 2006.

VAQUERO, C.G.P.; PERECIN, F. **Produção *in vitro* de embriões bovinos com suplementação de modificadores do metabolismo do triacilglicerol**. Laboratório de Morfofisiologia molecular e desenvolvimento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. 2015.

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, p. 100-109, 2008.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n. 3, p.915924, (2007).

WAGTENDONK-DELEEUW, A.M.; MULAART, E.; DE ROOS, J.S. et al. Effects of different reproduction techniques: al, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology**, v.53, n.2, p.575-597, (2000).

WANI NA, WANI GM, KHAN MZ, SALAHUDIN S. Effect of oocyte harvesting techniques on in vitromaturation and in vitro fertilization in sheep. **Small Rumin Res**, v.36, p.63-67, 2000.

WANI NA. In vitro maturation an in vitro fertilization of sheep oocytes. **Small Rumin Res**, v.44, p.89-95, 2002

WASSARMAN, P.M.; ALBERTINI, D.F. The mammalian ovum. In: The Physiology of Reproduction. 2 ed. Edited by E. Knobil and J.D. Neill, **Raven Press**, ltd, New York, 1994, p. 79-122.

WETHERINGTON, J. Introduction to Biotechnology: **A Georgia Teachers Resource Manual**. 2010, 87p.

WHITTINGHAM, D. G., LEIBO, S. P., MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . **Science**, v.178, p. 411-414, 1972.

WRENZYCKI, C.; STINSHOFF, H. Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 48, Suppl. 1, p. 38-43, 2013.