

INFLUÊNCIA DO OÓCITO NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E A QUALIDADE DO EMBRIÃO NA TAXA DE PREENHEZ

Autores: Pedro Luiz Ribeiro de Vasconcelos – Universidade Estadual de Goiás – pedroribeiro.ufrpe@gmail.com; Ana Carla Cavalcante BIOTEC/Universidade Estadual do Goiás- anacarlacavalcante5@gmail.com; Klayto José Gonçalves dos Santos BIOTECEC/Universidade Estadual do Goiás- klayto.santos@ueg.br

Tipo de Artigo: revisão de literatura; Tema: Outros temas

RESUMO: A qualidade dos oócitos bovinos é a análise primordial para produção de embriões *in vitro*, eles devem ser classificados de acordo com seu grau de qualidade, o que será diretamente responsável pela produção final dos embriões, que também são classificados em estágio e qualidade, esses dois fatores extremamente interligados são responsáveis pelos resultados obtidos com a utilização da biotecnologia. A PIVE é responsável por uma grande parcela do sucesso no melhoramento genético, valorização da bovinocultura, e lucratividade no mercado geral, envolvendo não somente o território nacional, como também o internacional.

Palavras chave: biotécnicas, reprodução, qualidade.

1INTRODUÇÃO

A utilização de biotecnologias aplicadas à reprodução de bovinos têm apresentado um crescimento exponencial ao longo dos anos, e a produção de embriões representa uma parcela importante desse mercado, segundo a SBTE(2019), a maior parte dos embriões foi gerada por produção *in vitro* correspondendo a 93.8%, e principalmente no segmento leite com 54.4%. A PIV consiste na produção de embriões em ambiente laboratorial, onde após a obtenção dos oócitos, eles são submetidos a fecundação, com sêmen previamente selecionado, convencional

ou sexado, o que permite ao proprietário direcionar a sua escolha especificamente para sua necessidade principal, melhorando o rebanho geneticamente e agregando valor ao seu produto. Segundo Viana et al (

Com o passar dos anos e as mudanças revolucionárias no mercado da pecuária, a PIVE tem ganhado mercado e visibilidade, no entanto, ainda existem barreiras que comprometem a eficiência da técnica, uma vez que diversos fatores intrínsecos e extrínsecos são capazes de afetar os resultados, a qualidade dos oócitos por exemplo, tem papel fundamental na conversão dos embriões, e os embriões propriamente ditos interferem na taxa de prenhez, de acordo com a sua qualidade.

Contudo, o objetivo dessa revisão foi esclarecer os aspectos que influenciam na produção *in vitro* de embriões e consequente taxa de prenhez.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica que consiste na produção de embriões a partir de técnicas laboratoriais de cultivo celular, com umidade e temperatura controlados, com o objetivo de formar um zigoto viável capaz de se desenvolver até o estágio embrionário desejado, e posteriormente ser transferido a uma fêmea apta (LUEDKE et al., 2019). Segundo Rizo (2008), 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.

Entre seus objetivos, o principal deles é o melhoramento genético de forma rápida e eficiente, reduzindo o intervalo entre partos, entretanto também permite a utilização de fêmeas de diferentes categorias (jovens e adultas), em várias fases do ciclo reprodutivo (lactação,

gestação), além de animais que apresentam alguma patologia do sistema reprodutivo ou correm risco de extinção (HASLER, 2014 RENESTO, 2004)

Com o desenvolvimento da técnica de punção folicular e recuperação de oócitos obtidos de fêmeas vivas, para a fertilização *in vitro* (FIV), a produção *in vitro* conseguiu alcançar o mercado e superar índices da TE clássica no que diz respeito à relação bezerro produzido por vaca por ano (DAYAN, 2001). Para Gonçalves (2019) a PIVE consolidou-se como a técnica de eleição para a produção de embriões bovinos, respondendo pelo maior percentual dos embriões produzidos não apenas em raças zebuínas de corte, mas também nos demais segmentos (taurinos, corte e leite).

2.2 Fatores que interferem na pive

A PIVE apresentou com o passar dos anos, um grande desenvolvimento, tanto em tecnologias como em utilização e eficiência, no entanto os processos podem ser afetados por diversos fatores que comprometem a qualidade do embrião e consequente prenhez da receptora. Em estudos realizados por Scanavez et al. (2013) a taxa de prenhez pode ser afetada pelo grupo genético da receptora, o lado do corpo lúteo, touro, cultivo do embrião, horas de serviço, número de inovulações e tempo de transporte. Mello et al. (2016) relataram que os fatores ligados à doadora podem influenciar positiva ou negativamente a PIVE, como o grupo genético, a categoria animal, o número de partos, a idade, a fase do ciclo estral, o estado nutricional, sanidade e a sazonalidade.

Em relação a raça da doadora, é importante levar em consideração que vacas *Bos indicus* apresentam maior produção e qualidade de oócitos quando comparadas a *Bos taurus*, assim como maior taxa de clivagem dos gametas (SALES et al., 2015). Em estudos realizados por Watanabe et al. (2017), a raça Senepol nos períodos de outono e inverno apresentaram menor taxa de blastocisto possivelmente pela pouca disponibilidade de forragens, enquanto fêmeas

holandesas tiveram menor taxa no verão, pelo provável stress térmico. O hormônio antimulleriano (AMH), é um possível indicador de números de folículos antrais e pode ser utilizado para indicar o desempenho reprodutivo das fêmeas, em seu estudo Batista et al. (2014) evidenciou que fêmeas *Bos indicus* possuem concentrações maiores de AMH.

A nutrição é outro fator que deve ser considerado, animais com peso abaixo ou acima do ideal, possuem maiores desafios para controlar fisiologicamente a reprodução, Chrenek et al. (2014) demonstraram que vacas de melhor ECC apresentaram maior porcentagem de oócitos de boa qualidade na OPU, porém as taxas de clivagem e de blastocistos foram semelhantes, levando-os a afirmarem que a PIVE é capaz de mascarar os efeitos do estado nutricional inadequado. O selênio adicionado na dieta de doadoras possui capacidade de interferir na qualidade e quantidade dos oócitos (MORAES et al., 2012).

A idade das doadoras também está relacionada ao bom desempenho durante a OPU, fêmeas muito jovens permitem um maior avanço genético, no entanto não possuem produção completa dos hormônios e apesar da alta recuperação de oócitos o desempenho das taxas de clivagem e formação de blastocistos é baixa (LANDRY et al., 2018). Já as fêmeas pré-púberes, em idade avançada possuem menor recuperação de oócitos, mas alta taxa de clivagem e blastocisto e fêmeas senis apresentam baixas taxas de produção em todos aspectos.

O macho também é capaz de influenciar de forma positiva ou negativa, Cummins (2001) relatou que a contribuição do espermatozoide para a PIVE é muito maior do que somente o seu DNA. Um dos principais problemas encontrados é a capacitação dos espermatozoides onde é necessário a utilização de substâncias capazes de capacitá-los, quando ocorrem anormalidades, principalmente estresse oxidativo, ocorre consequente falha no desenvolvimento do embrião (BARROSO et al., 2006). Fatehi et al. (2006) sugere que espermatozoides com danos no DNA durante a expressão gênica embrionária em estádios iniciais de desenvolvimento afetam o

mecanismo da apoptose do embrião, e através do bloqueio da mitose, interrompem o avanço no desenvolvimento embrionário.

Outros fatores capazes de interferir no produto final são o transporte e os meios de cultivo, exigindo meio de cultivo e atmosfera controlada com 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂ (CAVALIER et al., 2015). Contudo, muitas vezes a mão de obra qualificada também pode interferir nesses processos, quando não se tem atenção a quantidade dos produtos, horários, podem ocorrer perdas significativas.

2.3 Qualidade do oócito

Segundo Reis et al. (2006) animais que vão passar pela OPU devem estar na fase luteínica, com folículos de vários tamanhos no ovário, em relação corpo lúteo ocorrem variações de opiniões entre os autores, para Batista et al. (2016) relataram que a presença do corpo lúteo não influenciou a qualidade de oócitos imaturos, do ponto de vista nuclear e morfológico.

Chagas et al. (2014) coletou ovários de 198 fêmeas *Bos indicus*, totalizando 396 ovários, após seu abate no frigorífico municipal. Os ovários foram separados por categoria animal em nulípara ou múltípara. Posteriormente o animal os folículos ovarianos foram classificados em pequenos (<6mm), médios (6-9mm) ou grandes (>9mm). Os folículos maiores que 3mm de diâmetro foram aspirados e o completo cumulus-oócitos (CCOs) foi classificado em Grau I, Grau II, parcialmente desnudos, desnudos e/ou degenerados e com cumulus expandido. Na análise estatística não encontraram diferença na taxa de recuperação e na qualidade dos CCOs em fêmeas nulíparas versus as fêmeas múltíparas. Os folículos pequenos (< 6mm) tiveram maior taxa de recuperação de CCOs grau 1 quando comparados com folículos médios e grandes, porém têm uma menor taxa de recuperação total de folículos. Resultados semelhantes também foram encontrados por Fukui e Sakuma (1980), folículos menores têm maior taxa de oócitos

com qualidade superior.

A qualidade oocitária tem papel importante na etapa de maturação *in vitro*. Um oócito com baixa quantidade de camadas de células do cumulus, parcialmente desnudo ou desnudo têm mais dificuldades em adquirir competência durante a maturação. Os CCOs secretam hormônios esteróides, progesterona e estradiol que são importantes para expansão do cumulus e maturação meiótica (MAGALHÃES et al., 2011). Mesmo os folículos menores tendo maior taxa de recuperação de oócitos considerados de melhor qualidade, os oócitos recuperados de folículos de diâmetro médio e grande possuem maior competência para o desenvolvimento *in vitro*. Oócitos recuperados de folículos maiores gerou maior porcentagem de blastocistos que oócitos de folículos pequenos (HENDRIKSEN et al., 2000). Os hormônios secretados pelas células do cumulus ativam a maturação meiótica, essa ativação não acontece em oócitos recuperados de folículos pequenos (CECCONI et al., 2008). Rauber et al., (2003) diz que provavelmente os hormônios estimuladores estejam ausentes ou em menor concentração em folículos pequenos.

2.4 Qualidade de blastocistos

A Sociedade Brasileira de Tecnologia de embriões (SBTE, 2021), estabeleceu normas a serem utilizadas na classificação de qualidade dos embriões, as categorias são: mórula, blastocisto inicial, blastocisto expandido, em eclosão e eclodido. Sete dias após o cultivo é realizada a avaliação da formação e proporção de cada estágio que necessitam apresentar boa estrutura morfológica, os embriões são classificados em: Excelente ou bom, que possuem massa embrionária simétrica e esférica, com blastômeros uniformes em tamanho, cor e densidade, 85% do material celular viável, poucas células extrusas e zona pelúcida lisa; Regular onde possuem irregularidades moderadas na forma ou tamanho da massa embrionária, cor e

densidade das células, ao menos 50% do material celular viável; Pobre é visualizada grandes irregularidades na massa embrionária, cor e densidade, somente 25% viável; e Mortos ou degenerados que não estão viáveis, com o desenvolvimento parado ou atrasado (OLIVEIRA, et al, 2004).

Para Hafez (2004), a classificação se dá dessa forma:

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

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

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

B1 – Blastocisto: Pronunciada diferenciação do trofoblasto externo, MCI compacta e mais escura, blastocisto muito proeminente e embrião ocupando quase todo o espaço perivitelinico;

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

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

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

Para o sucesso do cultivo celular, é necessário meios que mimetizam o ambiente uterino e do oviduto no momento da gestação, com pH, nutrientes, hormônios e oxigênio adequados

para nutrição celular do embrião (FIGUEIREDO et al, 2010). Com 24 horas de fecundação, os oócitos são desnudados com auxílio de uma pipeta e transferidos para o meio de cultivo, em geral o Synthetic Oviductal Fluid(SOF) é utilizado por laboratórios. Podem ocorrer vários defeitos no momento da produção, como falta de compactação da massa celular, formação de vacúolos na massa embrionária, formação prematura de blastocele, alteração na razão de massa celular interna em relação às células trofoblásticas, alterações na expressão gênica e metabolismo celular (LONERGAN et al., 1999).

2.5 Influências na taxa de prenhez das receptoras

Vários fatores influenciam diretamente o resultado da produção *in vitro* de embriões (PIVE). Entre os fatores que influenciam o resultado, evidenciam-se o desenvolvimento do embrião, a qualidade do corpo lúteo da receptora e a sincronia da doadora e receptora (JELONSCHEK et al., 2018).

O controle do ciclo estral das receptoras precisa ser realizado para obter-se sucesso na PIVE (JONES & LAMB, 2008). O uso de protocolos em tempo fixo leva a altas taxas de sincronização e gestação das receptoras, 85% e 40-50% respectivamente, também exclui a necessidade de constatar o estro (BÓ et al., 2004). Veloso Neto et al. (2017) marcando a sincronia entre embrião e receptora de acordo com a apresentação do estro, um dia após a FIC (S/-1), no dia da FIV (S/0) e um dia antes da FIV (S/+1) teve resultados corroborando que a sincronia da receptora influencia nas taxas de prenhez. Em receptoras S/-1, S/0 e S/+1 teve 68,42%, 88,88% e 41,85% respectivamente.

Segundo Jelonschek et al. (2018) o estágio de desenvolvimento embrionário é uma das variáveis mais importantes para o sucesso da PIVE. Segundo Dayan (2001) maiores taxas de gestação foram obtidas ao fazer inovulação de embriões, produzidos *in vitro*, em

estádios de desenvolvimentos mais avançados, como blastocisto expandido e eclodido. Os resultados encontrados por Veloso Neto et al. (2017) exemplifica essa afirmação, em embriões em estágio inicial de desenvolvimento (mórula e blastocisto inicial) tiveram 25% de taxa de prenhez e em embriões em estágio mais avançados (blastocisto e blastocisto expandido) tiveram 57,14% de taxa de prenhez. Embriões transferidos em estádios iniciais podem ter mudanças bioquímicas e metabólicas que comprometam o desenvolvimento e reduzam a taxa de prenhez (VELOSO NETO et al, 2017).

A qualidade do corpo lúteo (CL) não está diretamente relacionada com sua classificação em relação ao tamanho, mas sim com sua capacidade de produzir progesterona. A taxa de gestação foi maior em vacas com mais de 5ng/mL de progesterona sérica e vacas com menos de 2ng/mL de progesterona sérica dificilmente conseguem manter a gestação (KENYOM et al., 2013). Em um compilado de estudos, Mann (2009) comparou o tamanho do CL com a concentração de progesterona sérica no 5º, 8º e 16º dia pós estro. O autor notou que o aumento da progesterona sérica ocorreu do 5º para o 16º dia, mas não foi condizente com o crescimento mínimo do CL. Mann (2009) concluiu que o CL influencia a progesterona sérica até o 8º dia do estro e quando atinge o tamanho físico maduro para de influenciar a progesterona. É preciso ressaltar que um CL considerado pequeno, na palpação retal, não implica que também seja pequeno no estroma ovariano e que um CL considerado grande pode conter pouca massa lútea (LEAL et al. 2009). A presença do CL se faz mais importante que o seu tamanho propriamente dito (VELOSO NETO et al., 2017).

2.6 Processo de seleção até cultivo

A primeira etapa para Produção in vitro de embriões é a seleção das possíveis doadoras que devem apresentar bom escore de condição corporal, genética corresponde ao objetivo,

ausência de anomalias genéticas que podem ser transferidas a sua progênie, saudáveis ginecologicamente e com ausência de doenças infectocontagiosas. Para obtenção do oócito imaturo, atualmente a técnica de eleição é a OPU (Ovum pick up), onde é realizada a aspiração folicular guiada por meio de ultrassonografia transvaginal (Alves et al., 2001). Esse procedimento possui muitas vantagens, como: pouco invasivo, utilização de fêmeas de diferentes idades, gestantes até 3 meses, 2 a 3 semanas após o parto, realização sem estimulação hormonal e obtenção de oócitos de fêmeas de alto mérito genético porém inférteis. (BOLS et al. 2012; VARAGO et al. 2008;).

Os oócitos aspirados devem possuir diâmetro de 2 a 8 mm e são observados na tela do ultrassom durante a punção folicular com agulha acoplada na sonda transvaginal, a agulha fica ligada a uma bomba a vácuo que leva os oócitos recuperados para o tubo e posteriormente serão avaliados e classificados, em 3 graus, I II e III que correspondem a ótimo, bom e regular e com citoplasma irregular e degenerado (desnudos), a classificação é fundamentada nas propriedades das células do cumulus e do aspecto do citoplasma do oócito de acordo com sua morfologia e quantidade de camadas, (GONÇALVES et al., 2008). É evidente que um processo significativamente complexo pode ser prejudicado por diversos fatores, como CO₂ e O₂, pH, temperatura, osmolaridade, uso do soro e células somáticas, o oócito se encontra pronto para fertilização após a extrusão do primeiro corpúsculo polar (AVELINO et al. 2002).

A próxima etapa é a maturação in vitro (MIV) que, de acordo com Fissore et al., (2002) consiste em uma série complexa de eventos nucleares e citoplasmáticos. Diferentes técnicas e protocolos já foram utilizados, e o TCM 199 é o mais comum em laboratórios, e possuem outras substâncias para suplementação, como soro fetal, gonadotrofinas, aminoácidos, vitaminas e antibióticos, além da necessidade de atmosfera e temperatura controlada

rigidamente. O óleo mineral é utilizado nessa etapa para evitar evaporação dos meios e colaborar com absorção de hormônios esteróides, nesse momento a maturação ocorrerá de 18 a 24 horas em atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007, 2008). Os processos já citados anteriormente serão responsáveis por desenvolver as alterações no oócito e permitir que ele se torne apto a fecundação, portanto os meios de cultivo devem simular o ambiente ovariano original para que tenham sucesso (SANGILD, 2000).

A Fertilização in vitro (FIV), é realizada após o cultivo estar completo, e corresponde a junção do oócito maduro com o espermatozóide, que após a fecundação evoluirá de zigoto até o estágio de blastocisto (MELO et al., 2016). Podem ser realizados testes para verificação adequada da concentração de sêmen e evitar poliespermia, segundo Young (1998), em geral, a concentração usada é de 2×10^6 espermatozóides / ml, calculada de acordo com a motilidade e concentração da fração viva de espermatozóides obtida após a centrifugação em gradiente Percoll. A FIV tem duração de 12 a 24 horas, em temperatura de 38,5°C, atmosfera com 5% de CO₂ em ar e umidade a 95% (CORRÊA, 2006). O sêmen de eleição pode ser convencional ou sexado, o meio adequado para a fertilização é Fert-TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato), que é capaz de promover a capacitação espermática.

A etapa de cultivo in vitro (CIV), é realizada após o término da FIV, é a fase que o zigoto se desenvolve até blastocisto e consiste em diversas transformações que impactaram na viabilidade do embrião, como clivagem, ativação do genoma, compactação dos blastômeros, diferenciação da distinção embrionária, formação e expansão da blastocele e rompimento da zona pelúcida (LONERGAN et al., 1999). Fair et al. (2001), afirma que os embriões produzidos in vitro possuem qualidade inferior aos produzidos in vivo, uma vez que a coloração do citoplasma é mais escura e com menor densidade devido maior conteúdo lipídico. De acordo

com, Slimane et al., (2000) afirmam que embriões produzidos in vitro contêm uma zona pelúcida mais frágil, com grande predisposição a anormalidades cromossomais.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A qualidade dos oócitos é capaz de interferir na produção de embriões, fatores relacionados à doadora estão diretamente ligados à qualidade desses oócitos, e devem ser levados em consideração no momento de seleção. A classificação dos embriões é fator importantíssimo, uma vez que os resultados podem ser alterados de acordo com a fase em que ele se encontra, por fim o sucesso da PIVE depende de um conjunto de processos tecnológicos e fisiológicos que são completamente dependentes para um resultado satisfatório.

4. ÓRGÃO FINANCIADOR E/OU AGRADECIMENTOS (OPCIONAL)

Agradecimento: Os autores o apoio financeiro dos Colégios Tecnológicos do Estado de Goiás (COTEC), Universidade Federal de Goiás (UFG), Centro de Educação, Trabalho e Tecnologia (CETT) da UFG, Fundação Rádio e Televisão Educativa e Cultural (FRTVE), em parceria com a Secretaria de Estado da Retomada (SER) e Governo do Estado de Goiás, através do Convênio no 01/2021 - SER (Processo nº. 202119222000153) por meio do Edital de Pesquisa COTEC/CETT/SER Nº 01/2022.

5 REFERÊNCIAS

ALVES, et al. **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.

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

BARROSO et al. **Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane**

translocation of phosphatidyl choline as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm sub-population. *Fertility and Sterility*, v. 85, p. 149-154, 2006. Disponível em: . doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.06.046.

BATISTA et al. **Plasma Antimüllerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in Bos indicus (Nelore) and Bos taurus (Holstein) Heifers.** *Reproduction in Domestic Animals*, v. 49, n. 3, p. 448-452, 2014. Disponível em: doi: 10.1111/rda.12304.

BATISTA et al. **Avaliação morfológica e nuclear de oócitos bovinos imaturos, obtidos de ovários com e sem a presença de corpo lúteo.** *Colloquium Agrariae*, v. 12, n. 2, p.1-5, 2016. Disponível em <<http://revistas.unoeste.br/revistas/ojs/index.php/ca/article/view/1764/1728>>. doi: 10.5747/ca.2016.v12.n2.a133.

BÓ, G. A.; MORENO, L.; CUTAIA, L.; BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L. Manipulação do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 32, p. 1-22, 2004.

BOLS et al. 2012. **High through put non invasive oocyte quality assessment: the search continues.** *Animal Reproduction*, [s.l.], v. 9, p. 420-425.

BRUM, Daniela dos Santos et al. **Cultivo individual de blastocistos bovinos produzidos in vitro.** *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 39, p. 87-92, 2002.

CAVALIER et al. **Estudo Sobre o Cultivo In Vitro de Embriões Bovinos Durante o Transporte.** *Ars Veterinaria*, v. 31, n. 1, p. 07-11, 2015. Disponível em: . doi: 10.15361/2175-0106.2015v31n1p07-11.

CECCONI, Sandra *et al.* Meiotic Maturation of Incompetent Prepubertal Sheep Oocytes Is Induced by Paracrine Factor(s) Released by Gonadotropin-Stimulated Oocyte-Cumulus Cell Complexes and Involves Mitogen-Activated Protein Kinase Activation. *Endocrinology*, [s. l.],

v. 149, p. 100-107, 1 jan. 2008.

CHAGAS, Vanessa M. *et al.* Fatores anatomofisiológicos que afetam a qualidade oocitária em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s. l.], v. 34, p. 34-38, 2014.

CHRENEK *et al.* **Effect of body condition and season on yield and quality of in vitro produced bovine embryos.** *Zygote*, v. 23, n. 6, p. 893-899, 2014. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/zygote/article/effect-of-body-condition-and-season-on-yield-and-quality-of-in-vitro-produced-bovine-embryos/F154C1F85A38EF72F132638442685CC5>>. doi: 10.1017/S0967199414000604.

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.

CUMMINS, J.M. **Cytoplasmatic inheritance and this implications for animal biotechnology.** *Theriogenology*, v. 55, p. 1381-1399, 2001. Disponível em: . doi: 10.1016/S0093-691X(01)00489-7.

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.

DE SOUZA, Natielly Sampaio; ABADE, Cristiane Caroline. **Produção in vitro de embriões bovinos: etapas de produção e histórico no Brasil.** *Ciência Veterinária UniFil*, v. 1, n. 3, p. 95-108, 2019.

FAIR *et al.* **Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production.** *Mol. Reprod. Dev.*, v. 58, p. 186-195, 2001.

FATEHI *et al.* **Damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages.** *Journal of Andrology*, v. 27, p.

176-188, 2006. Disponível em: . doi: 10.2164/jandrol.04152.

FIGUEIREDO et al. **Ovarian follicular dynamics in Ne Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. lore breed (Bos taurus indicus) cattle.** Theriogenology, [s.l.], v.47, p.1489-1505, 2010.

FISSORE et al. *Reproduction*, [s.l.], v.124, p.745-754, 2002.

FUKUI, Yu-ichi; SAKUMA, Yasuo. Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. **Biol. of Reprod.**, [s. l.], v. 22, p. 669-673, 1980.

GONÇALVES, LRL, VIANA, JHM. **Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo.** Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA-2019); Gramado, RS, 15 a 17 de maio de 2019.

GONÇALVES et al. **Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.31, p.212-217, 2007.

GONÇALVES et al. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.** 2.ed. São Paulo: Varela, 2008.

HAFEZ, B e HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal.** 7ª ed. Barueri- SP : Manole, 2004.

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.

HENDRIKSEN, P.J.M. *et al.* Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**, [s. l.], v. 53, p. 11-20, 2000.

JELONSCHEK, J. P. *et al.* Fatores que afetam a taxa de gestação de receptoras de embriões produzidos in vitro: Revisão de literatura. **Sci. Elec. Arch.**, [s. l.], v. 11, ed. 6, 2018.

JONES, A. L.; LAMB, G. C. Nutrition, synchronization, and management of beef embryo

transfer recipients. **Theriogenology**, [s. l.], v. 69, p. 107-115, 2008.

KENYON, A. G. *et al.* Minimal progesterone concentration required for embryo survival after embryo transfer in lactating Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 136, p. 223-230, 2013.

LANDRY *et al.* **Expression of atresia biomarkers in granulosa cells after ovarian stimulation in heifers.** *Reproduction*, v. 156, n. 3, p. 239-248, 2018. Disponível em: <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/156/3/REP-18-0186.xml#bib18>>. doi: 10.1530/REP-18-0186.

LEAL, L. da S.; OBA, E.; FERNANDES, C. A. de C.; SÁ FILHO, O. G. de. Avaliação do corpo lúteo, contratilidade uterina e concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol em receptoras de embriões bovinos. **Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science**, Goiânia, v. 10, n. 1, p. 174–183, 2009.

LUEDKE, F. E. *et al.* **Aspectos da produção in vitro de embriões bovinos no Brasil – revisão.** *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, v. 25, n. 1/2, p. 120-132, 1 out. 2019.

LONERGAN, *et al.* **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

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

MAGALHÃES, D.M. *et al.* In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, [s. l.], v. 75, p. 182-188, 2011.

MANN, G. E. Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 115, p. 296-299, 2009.

MELLO et al. **Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 40, n. 2, p. 58-64, 2016a. Disponível em:
<[http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v40/n2/p58-64%20\(RB602\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v40/n2/p58-64%20(RB602).pdf)>.

MORAES et al. **Oocyte aspiration and in vitro embryo production in Jersey cows with selenium-supplemented diet**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. Belo Horizonte, v. 64, n. 3, p. 787-795, 2012. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352012000400001>. doi:
10.1590/S0102-09352012000400001.

OLIVEIRA, et al. **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**. Embrapa Gado de Leite-Documents (INFOTECA-E), 2014.

RAUBER, Lucio Pereira *et al.* Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos mantidos em fluido folicular bovino de folículos de diferentes diâmetros. **Braz J vet Res anim Sci**, [s. l.], v. 40, p. 169-177, 2003.

REIS et al. **Efeito da estrutura ovárica e da idade de bovinos da raça Holstein Friesian na quantidade e qualidade de ovócitos e de embriões produzidos in vitro**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 43, n. 5, p. 629-636, 2006. Disponível em:<<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26571>>. doi: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26571.

RENESTO, A. Associação das biotécnicas: aspiração folicular guiada por ultra-sonografia e superovulação na produção in vitro e in vivo de embriões bovinos. Dissertação –

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias –UNESP. Jaboticabal. 2004.

SALES, J. N. S.; IOGUMA, L. T.; BATISTA, R. I. T. P; QUINTÃO, C. C. R; GAMA, M.

A. S.; et al. **Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows.** Journal of Dairy Science, v. 98, n. 5, p. 3086-3099, 2015.

Disponível em: <[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(15\)00137-X/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(15)00137-X/fulltext)>. doi: 10.3168/jds.2014-8858.

SANGILD, et al. **Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weight sin fetal and newborn calves derived from in vitro produced bovine embryos.** Biol. Reprod., v.62, p.1495-1504, 2000

SBTE-NORMAS DA SOCIEDADE DE TECNOLOGIA E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES. Disponível em: <http://www.sbte.org.br>. Acesso em: 28 Jul. 2021.

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.

SCANAVEZ, et al. **Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 65, n. 3, p. 722-728, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v65n3/17.pdf>>.

SLIMANE, et al. **A repetitive probe for FISH analysis of bovine interphase nuclei.** Genet. Sel. Evol., v. 32, p. 217-225, 2000.

VELOSO NETO, H. F.; SILVA, J. C. F.; PEREIRA, L. C.; ANDRADE, J. C. O.; MOURA, M. T.; BARTOLOMEU, C. C.; LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A. L. Parâmetros que afetam a taxa de prenhez de receptoras bovinas de embriões produzidos in vitro. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 31–35, 2017.

WATANABE et al. **Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its**

relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer.

Animal Reproduction, v. 14, n. 3, p. 635-644, 2017. Disponível em:

<[http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n3/p635-644%20\(AR1008\)%20SBTE.pdf](http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14n3/p635-644%20(AR1008)%20SBTE.pdf)>.

doi: 10.21451/1984-3143-

AR1008.

YOUNG et al. **Large of spring syndrome in cattle and sheep.** Rev. Reprod. [s.l.], v.3, p.155-

163, 1998.