

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES E NOVAS ESTRATÉGIAS NA PRODUÇÃO DE OÓCITOS EM BOVINOS

Márcio Vinícius Velho Batistela¹, Joyce Lara Souza Araújo Pereira¹, Vinício Araujo Nascimento², Marcia Dias²

¹Discentes do curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Jataí – UFJ, Jataí – GO.

²Docentes do curso de Zootecnia, Universidade Federal de Jataí – UFJ, Jataí – GO.
e-mail: vinicio_nascimento@ufj.edu.br

Recebido em: 15/11/2023 – Aprovado em: 15/12/2023 – Publicado em: 30/12/2023
DOI: 10.18677/EnciBio_2023D17

RESUMO

A crescente demanda por produtos de origem animal desempenha função propulsora da agropecuária brasileira. Os produtores e as indústrias buscam constantemente métodos e tecnologias que otimizem a produção animal, visando atender essa demanda. Objetivou-se realizar um estudo sobre os aspectos relevantes da PIVE em bovinos e discutir estratégias que são empregadas na atualidade para incremento na produção de oócitos. A Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE) é a biotécnica que consiste na fertilização de oócitos em laboratório, em condições controladas, para produzir embriões que serão transferidos para o útero de uma receptora bovina. A PIVE proporciona incremento na reprodução de animais de alto desempenho produtivo, viabilizando a criação de animais geneticamente superiores, maximizando o benefício genético produtivo e elevando a qualidade do rebanho bovino brasileiro. O Brasil é referência mundial na aplicação desta biotécnica. Há investimentos em pesquisas e alternativas que visam melhorar a eficiência, a viabilidade e a disseminação aos diferentes produtores. A PIVE avançou significativamente no campo, permitindo o rápido melhoramento genético das populações de gado e a conservação de raças ameaçadas de extinção.

PALAVRAS-CHAVE: Biotecnologia; Bovinocultura; Reprodução.

IN VITRO PRODUCTION OF EMBRYOS AND NEW STRATEGIES IN THE PRODUCTION OF OOCYTES IN BOVINE

ABSTRACT

The growing demand for products of animal origin plays a driving role in Brazilian agriculture. Producers and industries are constantly looking for methods and technologies that optimize animal production, in order to meet this demand. The objective was to carry out a study on the relevant aspects of PIVE in cattle and to discuss strategies that are currently employed to increase the production of oocytes. The *In Vitro* Embryo Production (IVP) is the biotechnique that consists of fertilizing oocytes in the laboratory, under controlled conditions, to produce embryos that will be transferred to the uterus of a bovine recipient. PIVE provides an increase in the reproduction of animals with high productive performance, enabling the creation of

genetically superior animals, maximizing the productive genetic benefit and raising the quality of the Brazilian cattle herd. Brazil is a world reference in the application of this biotechnique. There are investments in research and alternatives aimed at improving efficiency, viability and dissemination to different producers. PIVE has significantly advanced the field, allowing rapid genetic improvement of livestock populations and conservation of endangered breeds.

KEYWORDS: Biotechnology; Cattle breeding; Reproduction.

INTRODUÇÃO

A produção de carne bovina mundial foi equivalente a 67,88 milhões de toneladas, aproximadamente 20% da produção total de carne do mundo. O rebanho bovino brasileiro é constituído por aproximadamente 196,47 milhões de cabeças de animais distribuídos em 20% do território nacional. O que possibilitou que o Brasil colaborasse com 9,71 milhões de toneladas carcaça equivalente (TEC). na produção mundial de carne bovina, sendo que, deste total, 2,48 milhões TEC (25,51%) foram exportadas e 7,24 milhões TEC (74,49%) permaneceram no mercado interno (ABIEC, 2022). Com base nessas informações, é possível perceber que a pecuária bovina representa importante pilar da economia e do agronegócio brasileiro.

Mediante a inflação e efeitos da pandemia do COVID-19, o consumo de carne apresentou queda de 39,9 kg/ano *per capita* em 2019 para 24,4 kg/ano *per capita* em 2021 (ABIEC, 2020). Entretanto, o crescimento populacional é um dos principais impulsionadores no aumento da demanda pela produção de carne no mundo. O crescimento da produção de carne deverá ser de 11% até 2031 e, em contrapartida, o crescimento populacional deverá atingir 15% até o mesmo ano (FAO, 2022).

A pressão do mercado por produção de carne induz que produtores e a indústria busquem métodos e tecnificação adequada para atender à demanda, atingindo as metas produtivas com qualidade e retorno lucrativo para investimentos. A pecuária moderna, surge neste contexto como um método de otimização da atividade, visando tanto a busca por qualidades produtivas dos animais, quanto o aumento da velocidade do ciclo de produção, contribuindo para maior produção por área/ano (SILVA *et al.*, 2015).

Com a expansão do mercado e desenvolvimento da pecuária nacional, diferentes biotecnologias de reprodução foram desenvolvidas e aprimoradas. A produção *in vitro* de embriões (PIVE) influencia positivamente a eficiência reprodutiva precoce de animais em idade inferior a seis meses, diminuindo o intervalo de gerações; o melhoramento genético animal com a multiplicação do material genético da fêmea; a produção de animais transgênicos e como fonte de embriões sexados (RUMPF, 2007).

A PIVE é uma biotécnica onerosa que requisita alta tecnificação e tem riscos com baixo aproveitamento de oócitos. Dessa forma, a utilização de técnicas e métodos que reduzam os efeitos negativos e aumentam a viabilidade e a eficiência da PIVE são necessárias. Os pontos primordiais são a aspiração folicular (OPU - *Ovum pick-up*) e as etapas *in vitro*, que incluem maturação (MIV), fertilização (FIV), cultivo (CIV) até a transferência do embrião (TE), que podem ser beneficiados com o emprego de pesquisas e métodos para melhor utilização e exequibilidade da PIVE (SOUZA *et al.*, 2019).

O foco das pesquisas que buscam melhorias quanto às técnicas e etapas correlacionadas à PIVE, focam na quantidade de folículos e na qualidade oocitária, que é dependente de fatores intrínsecos e extrínsecos. Apesar dos aspectos que

podem dificultar a viabilidade e aplicabilidade da técnica, o Brasil é líder mundial na PIVE, tornando-se assim referência não só pelo domínio da técnica, mas pela qualidade do rebanho (VIANA, 2021).

A PIVE apresentou um crescimento de 31,5% (1.521.018 oócitos) em 2021, se comparado a 2020. Além disso, nos últimos 20 anos aumentaram as fecundações por PIVE em aproximadamente 300%. A América do Sul e a América do Norte foram responsáveis por 95,7% da PIVE em 2021 (VIANA, 2022). Portanto, compreender os avanços que já foram alcançados, bem como, as atualidades relacionadas à PIVE se fazem necessárias, visto a relevância da bovinocultura, bem como, das biotécnicas aplicadas à reprodução animal. Para tanto, torna-se importante compreender aspectos relevantes da PIVE em bovinos e discutir as estratégias empregadas para o aumento da eficiência no uso desta biotécnica

HISTÓRICO DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Os estudos com a utilização e manipulação de embriões iniciaram com invertebrados marinhos. Somente em 1978, a PIVE ganhou notoriedade com o nascimento do primeiro ser humano produzido *in vitro* (STEPTOE; EDWARDS, 1978).

Na década de 80, os estudos quanto aos fatores determinantes no sucesso ou fracasso da PIVE foram intensificados. Entre esses fatores foram evidenciados a importância da maturação citoplasmática e nuclear, bem como, a necessidade de estruturas como o *cumulus oophorus* ou células da granulosa (STAIGMILLER; MOOR, 1984).

Em 1982, ocorreu o primeiro relato do bezerro nascido por FIV, mas este não foi compreendido por PIVE completa, visto a maturação de oócitos *in vivo*. O procedimento de coleta de oócitos de TE para este animal foi realizado por laparotomia central média. A recuperação de oócitos mediante laparoscopia foi conduzida em 1983, enquanto a indução da superovulação (SOV), foi utilizada em 1985 (SIRARD *et al.*, 1985).

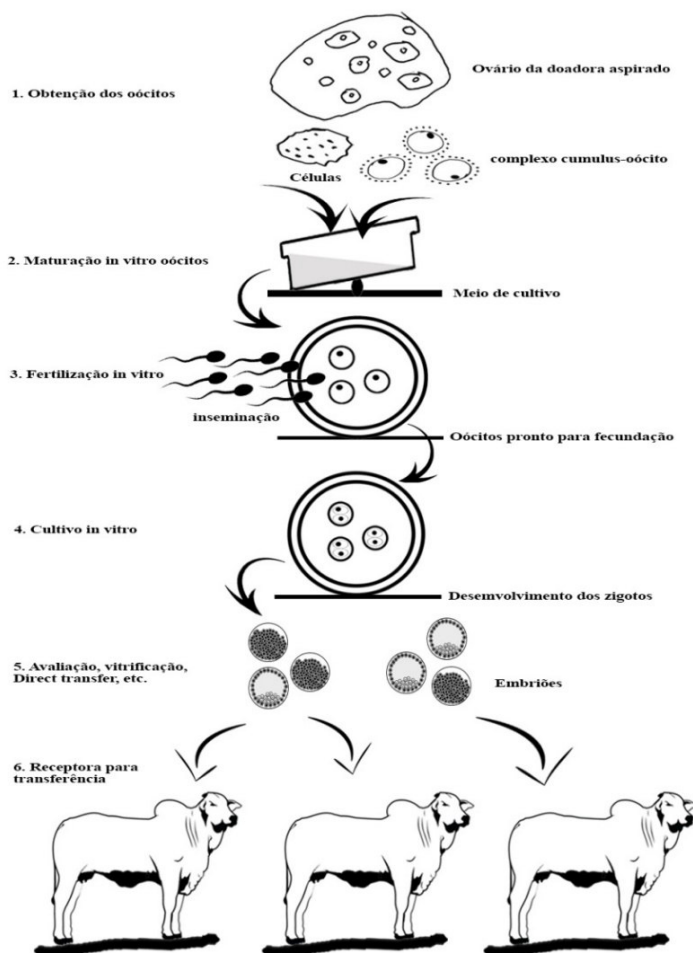
Pieterse *et al.* (1988) relataram a utilização da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (OPU), passo importante para a viabilidade e aplicabilidade da técnica a nível comercial. A expansão da utilização da PIVE e a virada histórica para que essa biotécnica fosse aplicada em larga escala tanto no campo científico como comercial se deu pelo desenvolvimento de técnicas de aspiração folicular

A década de 90 representou um período de estabelecimento da PIVE como biotécnica exequível. Portanto, parâmetros de controle de qualidade foram estabelecidos, a fim de reduzir a toxicidade nas células manipuladas, determinação de pontos críticos e aumento da produtividade final. A partir disso, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) foi capaz de produzir o primeiro bovino brasileiro totalmente *in vitro* (DODE; RUMPF, 2002). No final de 1998, a utilização de métodos de vitrificação de embriões e oócitos possibilitou o armazenamento de material biológico por maiores períodos de tempo (VAJTA *et al.*, 1998).

A chegada dos anos 2000 representou o estabelecimento e expansão da técnica do ponto de vista comercial (Figura 1). Nos cinco primeiros anos, o Brasil atingiu o patamar de líder na PIVE e, se tornou referência mundial na utilização da técnica em bovinos. Segundo Lima *et al.* (2014), o alto crescimento na utilização e adesão da PIVE no Brasil, ocorreu principalmente por fatores de mercado favoráveis, eficiência intrínseca na produção de embriões, desenvolvimento de

tecnologias associadas e investimento em pesquisas. A disponibilidade de utilização de sêmen sexado, a partir de 2005, contribuiu para que em 2017, se consolidasse como a técnica de eleição para a produção de embriões bovinos, tanto taurinos quanto zebuínos de corte e/ou leite.

FIGURA 1. Produção *in vitro* de embrião.



Fonte: os autores (2023).

OBTENÇÃO, SELEÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE OÓCITOS

A primeira etapa da PIVE consiste na obtenção do maior número de oócitos, com qualidade suficiente para maturação, fertilização e desenvolvimento inicial *in vitro*. Esta pode ser realizada por meio de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia - *Ovum pick up* (OPU) em doadoras vivas - ou pela coleta de ovários de animais *post mortem* pelo método de punção folicular, fatiamento dos ovários (*slicing*) e/ou pela curetagem da parede folicular (WANI *et al.*, 2000).

Inicialmente, a aspiração *in vivo* era realizada por laparotomia ventral média, após a superovulação, o que dificultava o procedimento devido ao tempo, custo e possíveis complicações pós-cirúrgicas, como aderência ovariana (LUEDKE *et al.*, 2019).

A OPU é uma técnica pouco invasiva idealizada para a realização da coleta de complexo *cumulus-oócito* em qualquer fase do ciclo estral, podendo ser realizada

para a obtenção de oócitos de fêmeas a partir dos seis meses de idade, idosas, pré-púberes, prenhez até o terceiro mês ou ainda, durante o pós-parto entre a segunda e terceira semana (VIANA; BOLS, 2005). Esta técnica pode ser realizada a cada 15 dias ou mensalmente, não interfere no estado fisiológico do animal e não exige estimulação hormonal exógena (VARAGO *et al.*, 2008).

A OPU é realizada por meio da punção folicular com uma agulha acoplada a uma sonda transvaginal, de modo que estes folículos são observados na tela do ultrassom. É utilizado um sistema de bomba a vácuo conectado à agulha para a colheita dos oócitos e do líquido folicular em um tubo coletor, que posteriormente será encaminhado ao laboratório para produção *in vitro* de embriões. Os folículos aspirados devem ter diâmetro entre 2-8 mm, folículos menores que 2 mm são incapazes de recomeçar a fase de meiose e os maiores que 8 mm são desprezados, pois normalmente se encontram em estágio de atresia, inviabilizando o processo de maturação *in vitro* (MIV) (GONÇALVES *et al.*, 2008; SOLLECITO *et al.*, 2019).

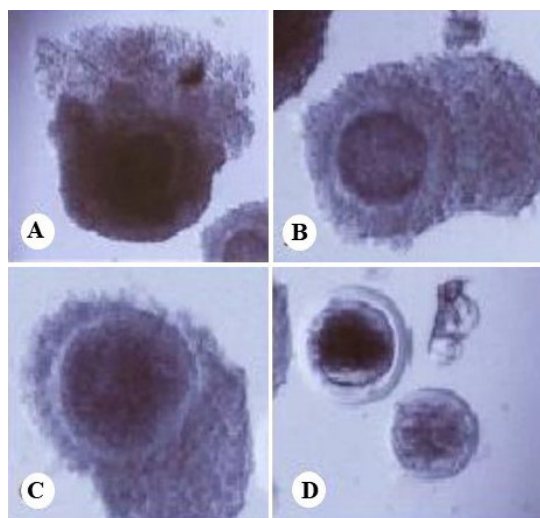
Na utilização de ovários oriundos de abatedouros, estes são coletados imediatamente após o abate e evisceração dos animais, identificados quanto ao lado (direito/esquerdo) e armazenados para transporte em solução salina a 0,9% e temperatura entre 35 a 37°C (CHACUR *et al.*, 2006). Os oócitos podem ser obtidos pela técnica do fatiamento dos ovários (*slicing*) ou do método de punção folicular com agulha acoplada a bomba a vácuo ou seringa. O uso de oócitos obtidos de ovários provenientes de abatedouros em programas de melhoramento genético não é recomendado, devido ao desconhecimento de histórico sanitário, nutricional e reprodutivo, uma vez que estes, de modo geral, são oriundos de descartes. Sendo assim, estes oócitos são destinados às pesquisas com transferência nuclear, produção de animais transgênicos, desenvolvimento *in vitro* e criopreservação de embriões (RUBIN *et al.*, 2009).

Após a recuperação dos oócitos, é feita a seleção com auxílio de um estereomicroscópio com base nas características das células do *cumulus* e aspecto do ooplasma, para posterior maturação *in vitro*. O potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário, é estimado por estas características de seleção do complexo *cumulus-oócitos* (CCO), (GONÇALVES *et al.*, 2002). Há a classificação em graus de I a IV, considerando viáveis CCO de classificação I a III, e descartando os de classificação IV (PENITENTE FILHO *et al.*, 2012).

Leibfried e First (1979) descreveram o sistema base que se classifica como:

1. Grau I: Oócitos com *cumulus* compacto e mais de três camadas de células. Ooplasma, com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom (Figura 2A).
2. Grau II: Oócitos com menos de três camadas de células do *cumulus oophorus*. Ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche todo espaço interior da zona pelúcida (Figura 2B).
3. Grau III: Oócitos que possuem o *cumulus* presente, mas expandido. Ooplasma contraído, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino, degenerado, vacuolizado ou fragmentado (Figura 2C).
4. Grau IV: Oócitos desnudos sem células do *cumulus*, citoplasma com cor e granulação anormais ou com células expandidas com aspecto apoptótico (Figura 2D).

FIGURA 2. Classificação morfológica dos complexos cumulus-oócitos. (2A) oócitos de grau I, (2B) grau II, (2C) grau III e (2D) oócitos superior grau IV e inferior grau V.



Fonte: Penitente Filho *et al.* (2012).

MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV) DE OÓCITOS

A maturação de oócitos representa uma etapa dependente de diversos eventos e modificações a nível de núcleo e citoplasma (FISSORE *et al.*, 2002). O processo de maturação em bovinos é considerado simples, visto que, mediante o cultivo *in vitro*, o fator de inibição da maturação oocitária se torna ineficaz. Na fisiologia de fêmeas bovinas, os picos de hormônio folículo estimulante (FSH) acarretam o início de desenvolvimento de alguns folículos primordiais contendo oócitos. Entretanto, somente com o oócito dominante irá finalizar o desenvolvimento e será ovulado, os demais oócitos irão interromper o desenvolvimento e sofrer atresia (GONÇALVES *et al.*, 2008). A partir do pensamento de poder se resgatar esses oócitos para que não sofram atresia e com a possibilidade de poder explorar ao máximo o potencial genético de fêmeas, se desenvolveram as técnicas para a maturação de oócitos imaturos *in vitro* (GILCHRIST *et al.*, 2008).

Apenas ovócitos plenamente competentes conseguem prosseguir e se tornarem de fato viáveis para a embriogênese, e essa competência é obtida, gradualmente, durante o processo de maturação, principalmente, durante os estágios finais da foliculogênese. Fisiologicamente, os oócitos se apresentam dormentes em diplóteno da prófase I até 12 h pré-ovulação, quando há o pico de hormônio luteinizante (LH) (HYTTEL *et al.*, 1997). Entretanto, no processamento *in vitro* dos oócitos, a maturação apresenta início espontâneo e ocorre quando os oócitos competentes são retirados do folículo e transferidos para os meios de cultivo, sem a necessidade de estímulo hormonal, como ocorre *in vivo* (DOWNS; VERHOEVEN, 2003).

A MIV dos oócitos de bovinos é inteiramente dependente das condições fornecidas e problemas durante essa etapa podem comprometer completamente a PIVE. A atmosfera, meio de cultivo, temperatura, suplementação proteica e fatores de crescimento são fatores que influenciam o sucesso na MIV (SANTOS *et al.*, 2002).

Previamente ao cultivo para maturação, os oócitos devem passar por uma lavagem tripla em meio de lavagem composto por TCM 199 Hepes suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 22 µg/mL de FSH e 50 µg/mL de LH. Enquanto a cultura para MIV é realizada em placas de *petri* contendo o meio MIV, composto por 100 µL de meio TCM 199 suplementado com bicarbonato, 10% de soro fetal bovino (SFB), 22 µL/mL de piruvato de sódio, 0,5 µg/mL de FSH e 50 µg/mL de LH e cobertas com óleo mineral para impedir a evaporação (SIRARD *et al.*, 1988).

O meio de cultura supracitado é o mais utilizado, mas a suplementação com outros compostos é amplamente estudada. Como exemplo, a adição de estradiol-17β, aminoácidos, tamponantes, antioxidantes, vitaminas e antibióticos. Em todos os estudos e ensaios conduzidos, foi demonstrado que a MIV influencia diretamente na taxa de produção de blastocistos e, conseqüentemente, no sucesso da PIVE (RODRIGUES; GARCIA, 2000).

Estudos são constantemente conduzidos para identificar quais os melhores suplementos durante essa etapa. Como exemplo, a utilização de quercetina ou cisteamina, em um sistema de alta concentração de oxigênio atmosférico, aumentou as taxas de produção de blastocistos (GUEMRA *et al.*, 2013). Além disso, estudos com a suplementação de melatonina em oócitos de bovinos acarretaram em melhor desenvolvimento durante a MIV (AN *et al.*, 2019). Lopes *et al.* (2019) observaram que a utilização de fluido folicular bovino promoveu maiores taxas de expansão do *cumulus oophorus*, aumentou a velocidade de desenvolvimento embrionário, bem como promoveu maior celularidade.

Outros antioxidantes, tais como o α-tocoferol, ácido ascórbico e selenito de sódio apresentaram aumento na taxa de desenvolvimento de blastocisto com aumento da celularidade nesta fase, bem como, promoveu espécies de oxigênio reativo e redução de genes apoptóticos (TRIPATHI *et al.*, 2023). A inclusão de zinco ao meio, também, promoveu melhor transcrição global e incrementou a competência meiótica (LODDE *et al.*, 2020).

Não somente o meio, mas a atmosfera de cultivo para a MIV deve ser controlada com 5% de CO₂ em ar, ou seja 20% de O₂ e umidade saturada, enquanto a temperatura deve ser mantida estável em 39°C. Após esse período os oócitos que maturaram podem ser identificados pela expansão do *cumulus* (GONÇALVES *et al.*, 2007). Ademais, o período da MIV é variável entre 16 e 24 horas, sendo que o padrão utilizado é de 24 horas de cultivo.

O tamanho dos folículos está também relacionado à capacidade de ovócitos maturados *in vitro* de se desenvolverem em blastocisto (LEQUARRE *et al.*, 2005). O crescimento folicular é um reflexo de sua competência para a maturação nuclear e para que se torne apto para fecundação e embriogênese. A fase de transcrição está atrelada ao crescimento do oócito, nesta etapa, o RNA mensageiro (mRNA) e proteínas presentes no citoplasma serão utilizadas pelo zigoto enquanto não atingem o estágio de oito células, no qual o genoma será ativado. Logo, células com bons estoques de mRNA e proteínas apresentam tamanho adequado e terão boa competência (MERTON *et al.*, 2003).

Embora o *cumulus* não seja fundamental para a maturação *in vitro*, os estudos sempre indicaram que sua presença resulta em uma maturação mais rápida e de melhor qualidade. Como consequência da presença do *cumulus*, a embriogênese apresenta melhores resultados e isso ocorre devido a comunicação formada nos CCO que afeta positivamente a competência do oócito (GONÇALVES *et al.*, 2002).

A comunicação durante o CCO ocorre por meio da transmissão de fatores pelo fluido folicular, bem como as *gaps junctions*, que são rede de canais que permitem a troca entre as células do *cumulus oophorus* e o oócito (GORDON, 2003). Essa interação permite a troca de nutrientes e reguladores de maturação que produzem fatores parácrinos que promovem a expressão de genes. Essa comunicação é diretamente influente na diferenciação oocitária e fundamenta a competência de desenvolvimento mediante fatores de crescimento produzidos pelas células da granulosa ou pelos próprios oócitos (FERRÉ *et al.*, 2020).

Conforme Di Pietro (2016), vesículas extracelulares, incluindo os exossomos, são originadas das células somáticas e oócitos e apresentam diversidade de proteínas, mRNA, lipídios e outros. Estudos utilizando essas vesículas extracelulares como indicadores da qualidade são crescentes, visto que as características dessas vesículas podem influenciar diretamente os resultados da PIVE, através de fatores antioxidantes e modulação precoce de transcrição embrionária (GROSS *et al.*, 2017)

As principais linhas de pesquisa e avanços na etapa de maturação incluem a pré-maturação *in vivo* com manutenção dos ovócitos no estágio de vesiculação germinativa com intuito que terminem a diferenciação pré-finalização da meiose (FERRÉ *et al.*, 2020). A retomada da meiose conduz a uma condensação cromossômica e, por sua vez, a parada da transcrição que bloqueia a síntese do RNA mensageiro materno, que é fundamental para o desenvolvimento embrionário antes da ativação genômica do embrião. Anteriormente, estudos que envolviam a utilização de inibidores específicos fator de promoção da fase M eram continuamente estudados, mas não apresentaram aumentos significativos na competência oocitária (MERMILLOD *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, a utilização de maturação oocitária fisiologicamente estimulada ganhou destaque, sendo que métodos de inibição meiótica por 12 horas com fármacos que elevam o teor de Adenosina 3'-5' Monofosfato cíclico (AMPC) no oócito associado ao uso de FSH para estímulo da maturação. Essa associação resultou em aumento de até 6 h no tempo de maturação e elevou a taxa e qualidade do desenvolvimento embrionário após a FIV (GUIMARÃES *et al.*, 2015).

O processo da MIV é essencial e delicado pelas modificações moleculares, nucleares e citoplasmáticas, que transformam o oócito imaturo em oócito maduro e apto para a fecundação, logo o meio utilizado deve reduzir condições que comprometem o desenvolvimento do oócito, tais como a oxidação e contaminação, bem como, devem favorecer e melhorar esse processo (SMITZ *et al.*, 2004).

FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

A fertilização reflete o momento no qual o gameta masculino (espermatozoide) se une ao gameta feminino, o oócito. A fecundação em mamíferos requer três pontos essenciais como a migração espermática entre células do *cúmulus*, fixação espermática através da zona pelúcida e fusão do espermatozoide e da membrana plasmática do óvulo (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A fecundação tem seu início na ligação do espermatozoide em receptores espermáticos espécie-específicos presentes na zona pelúcida do oócito. Estes receptores permitem a entrada do espermatozoide, pois promovem a reação acrossomal, que consiste em segmentações do acrossomo e fusão das membranas plasmáticas e acrossômicas do espermatozóide, permitindo a formação de vesículas de liberação de enzimas. Com as enzimas liberadas, ocorre a lise focal da zona pelúcida com conseqüente entrada do espermatozóide que, por sua vez, descarta o

capuchão acrossomático e, então, ocorre a fusão das membranas plasmáticas do espermatozóide e do oócito. A ligação do espermatozóide com o oócito resulta em aumento das oscilações intracelulares de cálcio, exocitose dos grânulos corticais, aumento do pH intracelular e despolarização da membrana do oócito que bloqueia primariamente a polispermia. O bloqueio secundário é proveniente da reação cortical ou reação de zona, após a entrada do espermatozóide que resulta na fusão da membrana plasmática com a membrana plasmática do oócito com a membrana dos grânulos corticais (GONÇALVES *et al.*, 2002).

Após a penetração espermática a meiose é completada, ocorre o envolvimento dos cromossomos pela membrana nuclear e há a liberação do primeiro e/ou segundo corpúsculo polar no espaço vitelino. Os pronúcleos migram para o centro do ovo e promovem um rearranjo no estroma do citoesqueleto, a partir disso, tem-se início a embriogênese (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A FIV é uma etapa de cultivo de oócitos maduros com os espermatozoides seguidos de uma fecundação que irá formar o zigoto que, por sua vez, irá se desenvolver em blastocisto. Portanto, após a MIV e a separação de espermatozoides viáveis deve-se desenvolver um meio adequado para a capacitação espermática e a fecundação. O sucesso da FIV está atrelado ao fornecimento de cultura e condições favoráveis para ambos os gametas (GORDON, 2003).

A FIV deve ocorrer em temperatura estável de 38,5 a 39°C por um período de 18 a 22 horas. Além disso, a atmosfera deve estar com 5% de CO₂ em ar e umidade a 95%. A capacitação espermática é uma das etapas que devem ser conduzidas, visto que os espermatozoides não passam por essa “maturação” como ocorreria *in vivo*, portanto, a utilização de meios de cultivo como o TALP-fert favorecem essa capacitação espermática por conter heparina em sua composição (MELLO *et al.*, 2016).

Antes de realizar a capacitação espermática, a aplicação de outras biotecnologias é comum. Como exemplo, a sexagem de sêmen que é empregada com a finalidade de produzir embriões em larga escala de determinado sexo. A técnica tem princípio na separação de espermatozoides portadores do cromossomo X e Y em duas populações com o uso de citometria de fluxo, baseado na quantidade de DNA de cada espermatozóide (SEIDEL Jr., 2003). Essa separação é possível visto que os espermatozoides Y apresentam menor quantidade de DNA, logo se coram menos pelos corantes fluorescentes e, dessa forma, podem ser separados dos demais. Vale ressaltar que, essa técnica apresenta em torno de 90% de pureza para o sexo desejado (SEIDEL Jr.; SCHENK, 2008).

Mesmo a técnica de sexagem de sêmen por citometria de fluxo ser amplamente utilizada, tem-se o questionamento sobre a eficácia, visto o grau de pureza e os prejuízos que podem causar aos espermatozoides e, conseqüentemente, menor fertilidade espermática (SEIDEL Jr.; SCHENK, 2008). Entretanto, a utilização de sêmen sexado ainda apresenta resultados variáveis e essa variação pode ser atribuída aos diversos protocolos laboratoriais (FERRÉ *et al.*, 2020).

A citometria de fluxo e sexagem incluem diversos procedimentos nos quais submetem o espermatozóide à coloração, diluição, centrifugação, pressurização, carga elétrica e outros (GARNER *et al.*, 2013). Todos esses procedimentos associados culminam em perda da capacidade funcional (LIU *et al.*, 2015). Portanto, técnicas mais modernas que envolvem a separação magnética de espermatozoides

Y com o uso de anticorpos específicos e aptâmeros têm sido sugeridas (FARINI *et al.*, 2016; SRINGARM *et al.*, 2022).

Quando a citometria de fluxo e/ou sexagem de espermatozoides é utilizada, métodos atenuantes da perda de capacidade funcional devem ser aplicados, como ajustes no tempo de incubação, suplementação do meio, concentração de heparina ou até métodos voltados para o manejo e seleção dos touros doadores, que incluem a utilização de sêmen de touros com alta fertilidade, utilização do sêmen de mais de um touro e entre outros (AN *et al.*, 2017).

Além disso, o sêmen é criopreservado para possibilitar transporte e prolongar o tempo de uso. Entretanto o processo de congelação-descongelação diminui a viabilidade seminal pois ocasiona danos nas estruturas fundamentais do espermatozóide, como o núcleo, citoesqueleto e membranas (PARKS; GRAHAM, 1992). Para a PIVE, a utilização de sêmen criopreservado ocorre em quase todos os casos. Logo, ao ter conhecimento de que a criopreservação diminui a viabilidade seminal, é necessário o emprego do método de separação após o descongelamento para a obtenção da fração espermática viva da palheta e, além disso, promovem o aumento da motilidade espermática. As principais técnicas utilizadas incluem o gradiente de *percoll*, *swim up* e o lavado espermático (GONÇALVES *et al.*, 2002).

No gradiente de *Percoll*, o sêmen é depositado em cima do *percoll* (45%) e centrifugado para separar os espermatozóides no *pellet* que se formam abaixo do conteúdo do *percoll*. Vale ressaltar que, o *percoll* é uma suspensão de partículas de sílica com polivinilpirrolidona (PVP). O método pelo gradiente de *percoll* é o mais empregado visto que permite a contagem da fração viva dos espermatozoides depois de descongelados (MELLO *et al.*, 2016). Já o método de lavado espermático consiste em repetidas centrifugações sendo que somente os espermatozoides são utilizados na fecundação.

Na técnica do *Swin up*, os espermatozoides são separados baseado na motilidade, ou seja, o sêmen é depositado no fundo de um tubo, é adicionado o meio SP-TALP. O tubo é armazenado em estufa a 39°C com atmosfera controlada de 5% de CO₂ em ar de 30 a 60 minutos em ângulo de 45°. Após essa incubação, os espermatozoides irão nadar no meio sentido a porção superior, e então é coletado o sobrenadante que passa por uma centrifugação, então coletado os espermatozoides vivos (GORDON, 2003). Essa técnica tem como benefício a alta eficácia de promoção da hipermotilidade dos espermatozoides congelados que se encontravam em estágio de dormência.

Após a seleção de espermatozoides viáveis, deve-se conduzir a capacitação espermática. No processo *in vivo*, a capacitação do espermatozóide para a fecundação acontece naturalmente dentro do trato reprodutivo feminino e ocasiona em hiperativação do espermatozóide com desestabilização da sua membrana plasmática. Entretanto, na FIV, esse processo não ocorre e demanda uma indução artificial da capacitação (VARAGO *et al.*, 2008).

A utilização de glicosaminoglicano heparina é eficiente na capacitação espermática de touros e possibilita a aplicabilidade da técnica de FIV. A utilização deste composto pode promover mudanças na composição bioquímica das membranas plasmáticas dos espermatozoides, sendo que a interação com o espermatozóide é mediada pela proteína carreadora de heparina (HBP) presente no plasma seminal de bovinos (GONÇALVES *et al.*, 2002).

Quando opta-se por técnicas de separação, que não promovem a hipermotilidade, igual a técnica de *Swim up*, considera-se a adição de compostos que possam contribuir para que o espermatozóide aumente a motilidade. Há

benefícios da suplementação da cafeína e/ou teofilina no meio de FIV para promover a hipermotilidade espermática, assim como a albumina sérica, a epinefrina, a penicilamina, a hipotaurina, a cafeína, o bicarbonato e o cálcio são substâncias que podem participar no processo de indução *in vitro* da capacitação espermática (PARRISH, 2014).

A utilização de modelos celulares epiteliais do oviduto bovino podem ser empregados na cultura *in vitro* e, dessa forma, promoverem modulação da função espermática pelo incremento da motilidade, capacitação e reação acrossômica, igualmente ocorreriam *in vivo* (LAMY *et al.*, 2017).

Durante a incubação do oócito maturado com o espermatozóide capacitado, haverá então a penetração do oócito pelo espermatozóide e isso desencadeia a cascata de alterações que levam a fecundação. No meio de cultivo TALP-fert, é incluso o sêmen envolto por heparina e de quatro a cinco CCO que são recobertos por óleo de parafina e incubados em atmosfera, temperatura e umidade controlada por 24 horas (GONÇALVES *et al.*, 2007). Entretanto, deve-se considerar que o uso de oócitos envelhecidos acarreta maiores taxas de polispermia, o que inviabiliza a fecundação.

A taxa de fecundação está atrelada principalmente ao número de espermatozoides fecundantes e a presença do primeiro corpúsculo polar. Para avaliar essa taxa de fecundação, alguns oócitos devem ser fixados, corados e observados em microscopia de contraste de fase 18 a 22 horas após a inseminação. Devendo ser observada a penetração do espermatozóide no ooplasma, inchaço de cabeça de espermatozóide, formação do pronúcleo, clivagem morfológica normal com formação de blastocisto, rompimento dos grânulos corticais e evidenciação da cauda do espermatozóide no ooplasma (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

CULTIVO *IN VITRO* (CIV) DE EMBRIÕES

O cultivo *in vitro* (CIV) é o período que compreende o desenvolvimento dos oócitos fertilizados, denominados zigotos, até o estágio de blastocisto. Esta etapa se refere ao período de desenvolvimento embrionário pré-implantação e é definida por eventos como clivagem, ativação de genoma embrionário, divisão celular, compactação dos blastômeros, diferenciação do trofoblasto e embrioblasto, formação e expansão do blastocele e rompimento da zona pelúcida (BUENO; BELTRAN, 2008).

A fase de CIV consiste na transferência do zigoto do meio FIV, após 24 horas de fecundação, para uma placa de “cultivo” com meios que podem variar entre meio simples otimizado enriquecido com potássio (KSOM), fluído sintético de oviduto (SOF) ou TCM-199 (LUSTOSA *et al.*, 2018). Por bastante tempo, células somáticas foram utilizadas para o co-cultivo de embriões, fornecendo bons resultados. Não obstante, com a constante busca de evolução esse sistema tem sido substituído com o passar dos anos por sistemas que utilizam meios semidefinidos com pouco ou sem soro como, os Charles Rosenkrans-1 (CR-1), Charles Rosenkrans-2 (CR-2), KSOM e SOF agregados à atmosfera gasosa controlada contendo baixa tensão de oxigênio (GONÇALVES *et al.*, 2007).

A zona pelúcida de embriões produzidos *in vitro* é mais frágil e possui maior tendência à anormalidades cromossômicas. Falhas 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, podem ocorrer no momento da produção (LONERGAN; FAIR, 2016).

A preparação do cultivo *in vitro* é decisiva para o êxito desta etapa, uma vez que a composição dos meios usados artificialmente deve simular o ambiente e os fluidos do útero e do oviduto de uma vaca durante o início da gestação. Nutrientes, pH, hormônios e oxigênio são fatores importantes para a preparação do CIV e devem estar presentes nas mesmas quantidades ou aproximadas ao ambiente uterino (FIGUEIREDO *et al.*, 1997).

Ademais, as condições de cultivo não somente influenciam a qualidade embrionária, como também colaboram para a tolerância ao procedimento de criopreservação (RIZOS *et al.*, 2002). A utilização de soro fetal bovino e albumina sérica bovina aprimoram a produção embrionária, mas podem comprometer a tolerância à criopreservação (RIZOS *et al.*, 2003). O CIV com uso de oviduto de coelhas, ovelhas, ratas e até mesmo homólogos bovinos promovem a qualidade de blastocisto, tolerância ao congelamento e atividade gênica e genômica do embrião, similar ao que ocorre *in vivo* (LAZZARI *et al.*, 2010; RIZOS *et al.*, 2010). Células epiteliais do oviduto bovino vêm apresentando efeitos benéficos no desenvolvimento e qualidade embrionária. A inclusão de fluido do oviduto maximiza esse efeito e melhora a qualidade do blastocisto e a tolerância ao congelamento (LI; WINUTHAYANON, 2017).

O período de variação de todo o processo de CIV é de sete a nove dias, dependendo de cada forma, técnica e meios utilizados pelos laboratórios em sua rotina de PIVE. Associado a isso, o processo ocorre em temperatura de 39°C, em estufas com atmosfera controlada (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) e umidade saturada (WRENZYCKI, 2016). A partir do sétimo dia de desenvolvimento, as estruturas serão engarrafadas à fresco ou submetidas à técnica de criopreservação: congelamento lento – embrião DT (*Direct Transfer* ou *One Step*); (LUSTOSA *et al.*, 2018).

O desenvolvimento embrionário acompanhado da compactação dos blastômeros e início da formação do blastocele pode ser visualizado no 6º dia de cultivo *in vitro*. A taxa de blastocisto normalmente é avaliada no 7º dia, em que é feita a seleção e avaliação final dos embriões para transferência a fresco ou para congelamento. Caso haja anseio em avaliar a taxa de eclosão *in vitro*, os blastocistos podem permanecer em estufa de cultivo até o 9º dia (GONÇALVES *et al.*, 2007).

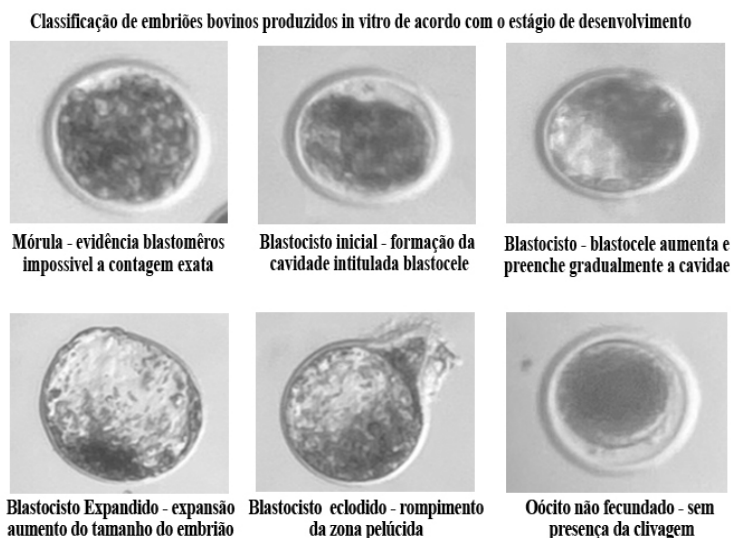
CLASSIFICAÇÃO DOS EMBRIÕES

O método de classificação morfológica é imprescindível para a seleção dos embriões satisfatórios à transferência a fresco e/ou criopreservação. Estruturas que apresentam adequado crescimento são consideradas aptas ao desenvolvimento pós-implantacional e possuem maior tolerância ao congelamento (SOUZA; ABADE, 2018). Os critérios de classificação são definidos pelas qualidades e estágios de desenvolvimento dos embriões, que são divididos em categorias (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998; VIANA, 2009).

A categoria mórula é caracterizada por uma massa de células com evidente divisão entre os blastômeros, ocupando o espaço vitelino quase por completo. Sucessivamente, o blastocisto inicial é descrito pela concepção do blastocele e início da diferenciação entre trofoblasto e botão embrionário. Já na categoria de blastocisto expandido, o embrião expande cerca de 1,5x o seu diâmetro e a membrana pelúcida reduz em 1/3 sua espessura. Quando o blastocisto está em eclosão, o embrião se encontra parcialmente livre da membrana pelúcida, com blastocele definida. E ao fim da eclosão (blastocisto eclodido), este embrião estará totalmente livre da membrana. A viabilidade, cor, formato, integridade da zona

pelúcida e aspecto morfológico, também se enquadram como fatores que classificam a qualidade dos embriões, (Figura 3), (SILVA *et al.*, 2017).

FIGURA 3. Classificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*



Fonte: os autores (2023).

ESTRATÉGIAS NA PRODUÇÃO DE OÓCITOS

A competência oocitária reflete a capacidade do oócito de completar a maturação, ser fertilizado, formar o blastocisto e se desenvolver em embrião viável passível de transferência embrionária de sucesso. A competência oocitária pode ser afetada em oócitos maturados *in vitro*, mas outros fatores como a idade, *status* reprodutivo, *status* metabólico, população folicular e estresse térmico da doadora de oócitos também podem influenciar (SIRARD, 2012).

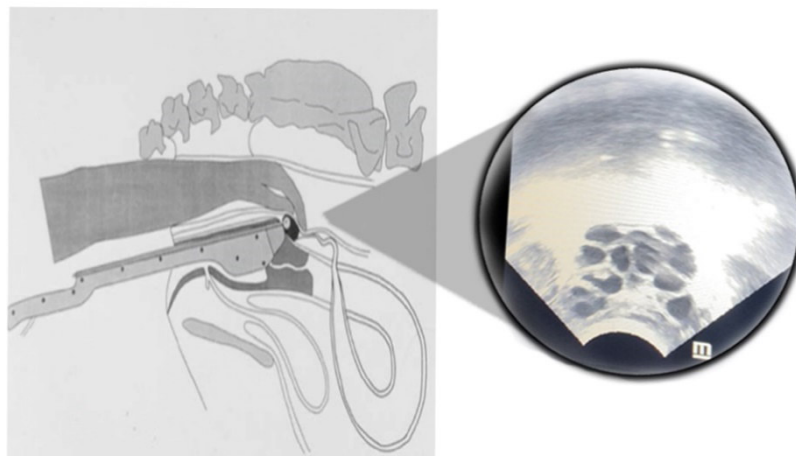
Animais muito jovens ou muito velhos apresentam redução na competência oocitária e desenvolvimento embrionário (RIZOS *et al.*, 2005). Animais muito jovens evidenciam mitocôndrias oocitárias imaturas, enquanto ao avançar da idade essas organelas apresentam perda gradual da função efetiva. Como exemplo, as novilhas pré-púberes apresentaram menores índices de PIVE, mesmo que estas fêmeas tenham apresentado maior número de folículos para a aspiração (LANDRY *et al.*, 2016). O número de CCO recuperados durante a OPU reflete na quantidade de embriões produzidos, quanto maior a população folicular, maior a quantidade de oócitos recuperados, (Figura 4), (MONTEIRO *et al.*, 2017; WATANABE *et al.*, 2017).

Baruselli *et al.* (2019) constataram que novilhas prenhes demonstraram maior eficiência na PIVE pelo maior número de embriões viáveis e maior taxa de blastocisto. Isso pode estar relacionado às alterações fisiológicas com liberação de substâncias e hormônios que influenciam direta ou indiretamente a característica dos oócitos recuperados na OPU.

A condição nutricional e metabólica da doadora influencia a OPU e a PIVE, visto que fêmea com alta condição corporal tem acúmulo de gordura nos ovários ou glândulas secretoras diversas, conseqüentemente, alteração na secreção de hormônios reprodutivos e metabólicos. O mesmo ocorre com fêmeas demasiadamente magras, em que há escassez de nutrientes e outros metabólitos para a síntese dos hormônios. As alterações nutricionais e metabólicas, também,

podem causar modificações nos padrões de crescimento folicular (BARUSELLI *et al.* 2016).

FIGURA 4. Diagrama mostrando a posição do transdutor de ultrassom pressionado contra o fórnice vaginal, com o ovário manualmente manipulado por reto e mantido contra a parede vaginal.



Fonte: Adaptado de Hasler e Barfield (2015).

O estresse térmico pode afetar a qualidade dos oócitos, visto que temperaturas elevadas podem romper o citoesqueleto, alterar a função da mitocôndria e afetar as células do *cumulus*, bem como, suas funções na maturação oocitária (BARUSELLI *et al.*, 2020). Os transtornos a nível mitocondrial estão relacionados à modificação de expressão gênica nos oócitos, o que influencia negativamente a fertilidade do animal (FERREIRA *et al.*, 2016). Variações de temperatura ao longo do ano podem ser responsáveis por perdas na PIVE (WOLFENSON; ROTH, 2019).

Métodos estratégicos empregados para melhorar a PIVE incluem a utilização do hormônio folículo estimulante (FSH), do manejo nutricional de propilenoglicol, da somatotropina bovina recombinante (r-BST) e de células tronco mesenquimais. Também, para incremento na recuperação de oócitos é fundamental o uso de protocolos induzindo a superovulação (SOV), os quais apresentam limitações ligadas ao número de manejos. Assim, constantemente são desenvolvidas novas estratégias para aprimorar e simplificar as técnicas de SOV pela redução de manejos usando maiores concentrações de doses ou associações nos tratamentos (VIEIRA *et al.*, 2016).

HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH)

A utilização do FSH, é amplamente utilizada e estudada visto a sua função estimulatória da superovulação. Protocolos com o estímulo por FSH não só são capazes de desenvolver múltiplos folículos ovarianos, aprimorar a coleta de embriões e aumentar a taxa de blastocisto, mas também aumentam a produtividade efetiva na PIVE (BLONDIN *et al.*, 2012).

Comercialmente, as preparações de FSH são feitas mediante a extração e purificação da hipófise do suíno, denominada FSH-p. O FSH-p atua igualmente nos

receptores de células da granulosa e, conseqüentemente, ocasionando estímulo de desenvolvimento de folículos ovarianos por mecanismos de inibição da apoptose (ARMSTRONG *et al.*, 2001).

O protocolo comumente utilizado para a indução de superovulação e melhorias em estratégias reprodutivas consideram a aplicação única, por via intramuscular (IM) de gonadotrofina coriônica equina (eCG) ou duas aplicações diárias (BID) por via IM de FSH-p durante quatro dias (PÉREZ-SANDOVAL *et al.*, 2019). A utilização do FSH-p apresenta efeito de curto-prazo, aproximadamente cinco horas após a aplicação (MONNIAUX *et al.*, 1983).

O uso do FSH se torna mais eficiente quando se utiliza o *coasting* associado. O *coasting*, por sua vez, é uma técnica que envolve a superestimulação com FSH para a promoção de folículos de médio e grande porte, seguidos da retirada de gonadotrofinas para se obter uma melhor competência oocitária e taxas de gestação (QUEIRÓZ *et al.*, 2021). Segundo Nivet *et al.* (2012), o *coasting* atua induzindo a pré-maturação oocitária e que o *coasting* de 44 horas foi positivo nos índices de PIVE em bovinos se comparado aos períodos de 10, 68 e 92 horas. No entanto, Kawamoto *et al.* (2017) observaram que em bezerras o período com melhores resultados foi entre 20 e 24 horas. Possivelmente, essa divergência esteja relacionada ao estágio de vida e maturidade sexual das fêmeas.

Contudo, o uso de FSH aparenta não elevar o número de folículos, mas somente o seu tamanho. Isso ocorre, pois somente folículos que atingiram o estágio antral de desenvolvimento respondem ao estímulo por gonadotrofina. Porém, cabe ressaltar que, aumento do diâmetro folicular indica aumento do desenvolvimento oocitário e aproximação do pico de hormônio luteinizante (LH), (SIRARD *et al.*, 2006). Ademais, a utilização desta gonadotrofina que os CCO provenientes de folículos de maior tamanho apresentam maior competência que os demais (KAUFFOLD *et al.*, 2005).

O LH pode ser via para aumentar a viabilidade do folículo pela criação de um ambiente pré-ovulatório. Nessa estratégia, o animal passa por um longo período de estímulo com FSH seguido de um período de 48 horas de *coasting* e finalizando com a administração de LH (BLONDIN *et al.*, 2012). Landry e Sirard *et al.* (2018) relataram eficiência na associação de FSH com hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) previamente à OPU, mas Fry *et al.* (2000) observaram que a associação de GnRH não melhorou a PIVE de bezerras.

Bezerras de até 11 meses apresentam menores índices associados a PIVE devido a menor competência ao desenvolvimento *in vitro*. Segundo Taneja *et al.* (2000), a competência de desenvolvimento *in vitro* ocorre a partir dos 11 meses em novilhas, logo animais com idade inferior a 11 meses devem ser estimuladas com gonadotrofina para se tornarem aptas a PIVE. Além do mais, bezerras pré-púberes quando estimuladas com FSH apresentaram maiores taxas de formação de blastocisto, elevação do número de folículos e melhor taxa e desempenho no CIV de óocitos (KAWAMOTO *et al.*, 2017).

Ao final do protocolo de estímulo por FSH, as fêmeas tratadas devem ser induzidas a uma ovulação sincronizada dos folículos superestimulados. O desenvolvimento de ajustes e protocolos para esse estímulo deve ser baseado em eventos fisiológicos (MAPLETOFT *et al.*, 2015). O ajuste hormonal deve ser realizado com base na utilização de doses decrescentes de FSH que, conseqüentemente, induzem a superestimulação dos folículos, mas há a controvérsia de que o uso constante de FSH apresenta resultados tão bons quanto o decréscimo gradual de FSH (CIRIT *et al.*, 2019).

Silva *et al.* (2009) realizaram uma pesquisa com a utilização FSH (100 mg em doses decrescentes) em duas aspirações foliculares em fêmeas nelores de 12 a 24 meses com intervalo de 40 dias. Os autores observaram que o FSH reduziu a taxa de OPU, mas as taxas de formação de blastocisto foram superiores nas novilhas mais jovens (12 meses). Já Elliff *et al.* (2019) observaram que a utilização de FSH aumentou a taxa de clivagem e número de blastocistos por OPU. Entretanto, estudos demonstram que a utilização excessiva de FSH-p para induzir a superovulação de vacas pode comprometer a função folicular ovulatória e pode estar associado a um comprometimento da qualidade oocitária e as taxas reprodutivas (KARL *et al.*, 2021)

Além do FSH-p, frequentemente são conduzidos estudos com a utilização de FSH recombinante bovino (bscrFSH) e sua utilização tem demonstrado redução do número de aplicações e melhor resposta na superovulação associada a produção viável de embriões de sêmen fresco ou criopreservado. O bscrFSH pode ser alternativa eficiente, nova e segura de condução da superovulação mediante aplicação única em intervalos de 24h com quatro dias de aplicação (GUTIÉRREZ-REINOSO *et al.*, 2022).

Gutiérrez-Reinoso *et al.* (2023) constataram que o emprego de bscrFSH na produção de embriões com de vacas superovuladas não apresentou diferenças significativas quanta a estrutura de folículos e folículos não ovulados se comparado ao FSH-p. Entretanto, ressaltaram melhora significativa no CL de fêmeas submetidas a protocolos de superovulação com bscrFSH.

MANEJO NUTRICIONAL DE PROPILENOGLICOL (PG)

A dieta é fator importante de influência na fase da aspiração folicular e o desenvolvimento embrionário, sendo que a alimentação desbalanceada apresenta efeitos negativos na produção embrionária *in vivo* e *in vitro* (GAMARRA *et al.*, 2015). Quando se observa déficit energético em dietas de vacas destinadas à reprodução, os teores glicêmicos e insulínicos reduzem e a frequência de pulso de LH decai. Isso contribui para restrição da concentração de estrogênio, fundamental para o desenvolvimento folicular (BUTLER, 2000).

Por outro lado, dietas restritivas com balanceamento adequado se mostram favoráveis a PIVE, colaborando para um bom desenvolvimento embrionário em decorrência de melhor qualidade oocitária e produção de blastocisto. Dietas com altos teores de energia em vacas leiteiras evidenciaram aumento significativo dos teores de insulina e fator de crescimento associado à insulina 1 (IGF-1), o que estimulou o crescimento folicular pré-superovulação (HIDALGO *et al.*, 2004).

A utilização de PG possibilitaria redução da cetose por modulação na secreção insulínica e elevação dos teores glicêmicos, com redução das concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e β -hidroxibutirato (BHB), (NIELSEN; INGVARTSEN, 2004). Após a administração oral do PG, parte deste composto é metabolizado para propionato, que no ciclo de *Krebs* diretamente no nível de succinil-CoA, também converte glicerol, aminoácidos glicogênicos e ácido láctico em glicose, e oxidação do lactato (RIZOS *et al.*, 2008).

Gamarra *et al.* (2015) ao estudarem o efeito da aplicação oral de PG em novilhas em diferentes estágios, observaram aumento nas concentrações de insulina, glicose e IGF-1. Houve aumento no número e na qualidade de folículos medidos na superovulação, e também os embriões apresentaram boa qualidade e viabilidade.

Rezende (2019) evidenciou que a utilização de PG (500 mL BID por cinco dias), aumentou as concentrações sanguíneas de glicose, insulina, diminuiu a AGNE e o BHB, entretanto não aumentou as concentrações séricas de IGF-1. Contudo, evidenciou que as taxas de PIVE foram melhores em novilhas, vacas em início de lactação ou secas, mas não surtiu efeito em vacas no final da lactação. O uso do propilenoglicol em aplicação direta durante a PIVE, como na vitrificação oocitária aumentou a taxa de viabilidade, entretanto observou-se efeito tóxico do PG nos óocitos (SOMFAI *et al.*, 2013).

SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE (r-BST)

O eixo somatotrópico possui influências sobre as funções ovarianas e é composto pelo hormônio do crescimento (GH), receptor de GH, IGF-1, proteínas carreadoras de IGF e receptores de IGF (RADCLIFF *et al.*, 2004). A somatotropina é um hormônio de crescimento que influencia a regulação do crescimento, diferenciação de diversas células e comanda processos fisiológicos e metabólicos de órgãos e tecidos (FERRAZ *et al.*, 2015).

A somatotropina bovina recombinante (r-BST), surge neste contexto como estratégia associada a super estimulação gonadotrófica. A r-BST foi um dos primeiros fatores de crescimento produzidos em grande escala para a indústria animal com proteína recombinante e, inicialmente, visava o aumento da produção leiteira (BORGES *et al.*, 2001).

Gong *et al.* (1997) constataram aumento significativo de concentrações séricas de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e insulina ligado ao uso de r-BST. Apesar da maioria dos tecidos responderem a este hormônio, boa parte dos receptores se encontram no fígado, estes são responsáveis pela produção de IGF-1. No sistema reprodutor, o r-BST atua sobre os receptores do útero e ovário induzindo à produção de IGF-1, contribuindo expressivamente para maturação e competência oocitária (NAGANO *et al.*, 2004).

A r-BST atua aumentando os receptores de IGF-1, estimulando a produção deste fator e acarretando o recrutamento folicular ovariano (RIBEIRO, 2018). Em programas como a PIVE, o uso de r-BST em doadoras de bovinos objetiva a alteração significativa do número de folículos ovarianos adequados para a punção, assim como o rendimento e a qualidade dos CCO recuperados e as taxas de produção *in vitro* de blastocistos rates (BURATINI Jr. *et al.*, 2000). Os efeitos da administração de r-BST em novilhas consistem no aumento do número de folículos menores que 5mm, enquanto em vacas, o aumento refere-se ao número de folículos médios entre 6 a 9mm. Tais alterações, insinuam que a população folicular é o alvo do tratamento do r-BST, podendo variar de acordo com a raça e condições metabólicas da lactação (MOTA *et al.*, 2012).

O mecanismo responsável pelo crescimento da população folicular através do r-BST, não está completamente elucidado, desta forma, alguns autores sugerem o efeito direto do hormônio do crescimento, enquanto outros acreditam que as alterações ocorrem a teores plasmáticos de IGF-1 e/ou insulina (SÁ FILHO *et al.*, 2009).

CÉLULAS-TRONCO

As células tronco (CT) são células indiferenciadas, com potencial de auto renovação e de diferenciação em mais de uma linhagem celular. As CT são classificadas de acordo com a sua potencialidade de diferenciação em: totipotente, pluripotentes ou multipotentes. As CT totipotentes, são obtidas a partir de zigotos e se diferenciam em todos os tipos celulares, incluindo os anexos extraembrionários.

As CT pluripotentes são células embrionárias observadas na massa interna do blastocisto e possuem capacidade de derivar todas as células do folheto germinativo. As células-tronco mesenquimais (MSC) são células adultas, classificadas como multipotentes devido ao seu potencial de se diferenciarem de tipos celulares como osteoblastos, adipócitos e condrócitos, e tais características as colocaram como alvo de pesquisa nos últimos anos (BRAVO, 2022; OLMEDO-MORENO *et al.*, 2022).

As MSC possuem habilidade pró-regenerativa e propriedades imunomoduladoras por intermédio de sinalização parácrina e devido a sua capacidade de locomoção em locais de injúria (KOSARIC *et al.*, 2019). Estas células podem ser extraídas de diversas fontes, como medula óssea, tecido adiposo, fígado, placenta, cordão umbilical e polpa dentária (KREBSBACH; VILLA-DIAZ, 2017). Considerando a facilidade de obtenção e isolamento de MSC, o seu uso tem sido relatado em técnicas na medicina regenerativa, uma vez que ostentam taxa elevada de proliferação e habilidade de diferenciação (ONG; SUGII, 2013).

A utilização de MSC é descrita como auxílio para recuperação de danos originados na secreção hormonal, contribuindo no reparo da foliculogênese e diminuindo a apoptose das células ovarianas, em casos de problemas reprodutivos (SONG *et al.*, 2016). Para medicina veterinária, estas células foram marcadas como possível método terapêutico, tanto em casos de azoospermia em machos, como em falência ovariana prematura em fêmeas (FAZELI *et al.*, 2018). Malard *et al.* (2020) evidenciaram que a aplicação direta de MSC em lesões ovarianas decorrentes da técnica de OPU demonstraram uma melhora significativa na obtenção de oócitos pela OPU.

Há resultados promissores na recuperação da funcionalidade de variados órgãos através do transplante de MSC autólogas (provenientes do mesmo indivíduo) ou alogênicas (provenientes de outro indivíduo). A utilização de células alogênicas providas de doadores jovens e sadios, em terapia celular, permite rapidez e facilidade no tratamento com MSC (MARX *et al.*, 2015). A terapia com MSC em ovários bovinos pode proporcionar aumento na quantidade de folículos e melhora na qualidade dos oócitos, com impacto positivo na PIVE.

Soares *et al.* (2018) desenvolveram um estudo em que, 27 vacas Nelore foram submetidas à sincronização de onda folicular e duas OPU com intervalo de 30 dias, após a segunda OPU, os animais foram divididos em três grupos experimentais: Controle (sem tratamento; n=7); MSC1 (tratamento com 5 x 10⁶ células-tronco em um ovário; n=10) e; MSC2 (tratamento com 5 x 10⁶ células-tronco em cada ovário; n=10). Após o tratamento com as MSC, os animais foram submetidos à sincronização de onda folicular e OPU aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. No estudo foi constatado que os animais tratados com MSC obtiveram elevação da taxa de recuperação oocitária, taxa de oócitos viáveis, taxa de clivagem, taxa de blastocisto e taxa de blastocisto eclodido. Desta forma, é notável que a utilização de CT em fêmeas bovinas pode ser uma opção viável para possibilitar crescimento nos índices da PIVE com impacto direto na bovinocultura.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE) se tornou uma estratégia moderna e essencial para a agropecuária, que não deve ser conhecida somente como mais uma biotecnologia reprodutiva, mas como uma revolução tecnológica aplicada à reprodução. A biotécnica possibilita a criação de animais geneticamente superiores, além de preservar espécies bovinas em risco de extinção e, considerando pontos

éticos fundamentais, é uma aliada para a segurança alimentar e a produção de alimentos.

Inúmeros fatores podem interferir de maneira positiva na PIVE, possibilitando o aumento da sua eficiência e tornando-a um processo acessível comercialmente. Apesar disso, ainda há limitações em aspectos como a qualidade e quantidade de oócitos a serem recuperados, fazendo com que haja necessidade de investimentos em pesquisas e estudos, para o aperfeiçoamento da biotécnica e, com isso, torná-la mais rápida, eficiente e precisa.

Os tratamentos com FSH, r-BST, propilenoglicol e células-tronco têm potencial para aperfeiçoar a qualidade oocitária e, conseqüentemente, a produção de embriões, por isso devem receber maior atenção e investimentos, seja tecnológico e/ou financeiro.

REFERÊNCIAS

ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Beef Report: perfil da pecuária no Brasil 2020**. ABIEC, 2020. 50p. Disponível em: <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2020/>. Acesso em: 15 mar. 2023.

ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Beef Report: perfil da pecuária no Brasil 2022**. ABIEC, 2022. 72p. Disponível em: <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2022/>. Acesso em: 15 mar. 2023.

AN, L.Y.; CHAUBAL, S.A.; LIU, Y.; CHEN, Y.; NEDAMBALE, T.L *et al.* Significant heparin effect on bovine embryo development during sexed in vitro fertilization. **Journal of Reproduction and Development**, v.63, n.2, p.175–183, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1262%2Fjrd.2016-142>. Acesso em: 13 mar. 2023.

AN, Q.; PENG, W.; CHENG, Y.; LU, Z.; ZHOU, C. *et al.* Melatonin supplementation during in vitro maturation of oocyte enhances subsequent development of bovine cloned embryos. **Journal of Cellular Physiology**, v.234, n.10, p.17370-17381, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.28357>. Acesso em: 13 mar. 2023.

ARMSTRONG, D.G.; MCEVOY, T.G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J.J.; HOGG, C.O. *et al.* Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, v.64, n.6, p.1624– 1632, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.6.1624>. Acesso em: 13 mar. 2023.

BARUSELLI, P.S.; VIEIRA, L.M.; SÁ FILHO, M.S.; MINGOTI, R.D.; FERREIRA, R.M. *et al.* Associations of insulin resistance later in lactation on fertility of dairy cows. **Theriogenology**, v.86, n.1, p.263-269, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.039>. Acesso em: 5 abr. 2023.

BARUSELLI, P.S.; ELLIFF, F.M.; SILVA, L.G.; CATUSSI, B.L.C.; BAYEUX, B.M. Estratégias para aumentar a produção de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.43, n.2, p.315-326, 2019. Disponível em: [http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p315-326%20\(RB813\).pdf](http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p315-326%20(RB813).pdf). Acesso em: 12 mar. 2023.

BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; VIEIRA, L.M.; SOUZA, A.H.; BÓ, G.A. *et al.* Use of embryo transfer to alleviate infertility caused by heat stress. **Theriogenology**, v.155, n.1, p.1-11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.028>. Acesso em: 11 mar. 2023

BLONDIN, P.; VIGNEAULT, C.; NIVET, A.L.; SIRARD, M.A. Improving oocyte quality in cows and heifers-What have we learned so far? **Animal Reproduction**, v.9, n.3, p.281-289, 2012. Disponível em: <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6058f7783717068b46e7>. Acesso em: 17 mar. 2023.

BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M.; ROCHA Jr., V.R.; CARVALHO, G.R. Resposta superovulatória de novilhas mestiças holandês-zebu tratadas com somatotropina bovina recombinante (rbST). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1439-1444, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000600008>. Acesso em: 18 mar. 2023.

BRAVO, M.O. **Aplicação de bactérias extracelulares de células-tronco mesenquimais (VEs-CTMs) na produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2022. 137p. Tese em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília-DF. Disponível em: <https://bdtd.ucb.br:8443/jspui/handle/tede/3075>. Acesso 13 mar. 2023.

BUENO, A.P.; BELTRAN, M.P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.6, n.11, p.1-7, 2008. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/pyqdj1dprseHFgW_2013-6-13-15-24-57.pdf. Acesso em: 25 mar. 2023.

BURATINI Jr., J.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A.; BÓ, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v.54, n.3, p.421-431, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00359-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00359-9). Acesso em: 11 abr. 2023.

BUTLER, W.R. Nutritional interactions with reproductive performance dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, n.2, p.449-457, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00076-2](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00076-2). Acesso em: 15 mar. 2023.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.22456/1679-9216.15070>. Acesso em: 28 mar. 2023.

CIRIT, Ü.; ÖZMEN, M.F.; KÜÇÜKASLAN, İ.; KÖSE, M.; KUTSAL, H.G. *et al.* Effect of the interval from follicle aspiration to initiation of lengthened FSH treatment on follicular superstimulatory and superovulatory responses and embryo production in lactating Simmental cows. **Theriogenology**, v.128, n.1, p.218-224, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.02.008>. Acesso em: 15 mar. 2023.

DI PIETRO, C. Exosome-mediated communication in the ovarian follicle. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.33, n.3, p.303-311, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0657-9>. Acesso em: 15 mar. 2023.

DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões – eficiência, limitações e perspectivas futuras: visão da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. In: **Anais do workshop sobre embriões bovinos produzidos in vitro: perspectivas de utilização e possíveis impactos na pecuária brasileira**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite. p.13-26. (Documentos, 88). 2002. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/594812/1/Anaisdoworkshop.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2023.

DOWNS, S.M.; VERHOEVEN, A. Glutamine and the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes: influence of culture medium, glucose, and cumulus cells. **Molecular Reproduction and Development**, v.66, p.90-97, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.10326>. Acesso em: 13 mar. 2023.

ELLIFF, F.M.; GUIMARÃES, E.C.; FÉRES, L.F.R.; BAYEUX, B.M.; COLLI, M.H.A. *et al.* Effect of treatment with follicle-stimulating hormone on in vitro embryo production of Gyr (*Bos indicus*) calves, pubertal heifers and adult cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v.31, n.1, p.191-191, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RDv31n1Ab132>. Acesso em: 18 mar. 2023.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical Yearbook: World Food and Agriculture 2022**. FAO, 2022. 380p. Disponível em: <https://www.fao.org/3/CC2211EN/online/CC2211EN.html#>. Acesso em: 15 mar. 2023.

FARINI, V.L.; CAMAÑO, C.V.; YBARRA, G.; VIALE, D.L.; VICHERA, G. *et al.* Improvement of bovine semen quality by removal of membrane-damaged sperm cells with DNA aptamers and magnetic nanoparticles. **Journal of Biotechnology**, v.229, p.33-41, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.05.008>. Acesso em: 16 mar. 2023.

FAZELI, Z.; ABEDINDO, A.; OMRANI, M.D.; GHADERIAN, S.M.H. Mesenchymal stem cells (MSCs) therapy for recovery of fertility: a systematic review. **Stem Cell Reviews and Reports**, v.14, p.1-12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12015-017-9765-x>. Acesso em: 19 mar. 2023.

FERRAZ, M.L.; SÁ FILHO, M.F.; BATISTA, E.O.S.; WATANABE, Y.F.; WATANABE, M.R. *et al.* Paradoxical effects of bovine somatotropin treatment on the ovarian follicular population and in vitro embryo production of lactating buffalo donors submitted to ovum pick-up. **Animal Reproduction Science**, v.154, p.1-7, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.12.017>. Acesso em: 13 mar. 2023.

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

FERREIRA, R.M.; CHIARATTI, M.R.; MACABELLI, C.H.; RODRIGUES, C.A.; FERRAZ, M.L. *et al.* The infertility of repeat-breeder cows during summer is associated with decreased mitochondrial DNA and increased expression of mitochondrial and apoptotic genes in oocytes. **Biology of Reproduction**, v.94, n.3, p.1-10, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.133017>. Acesso em: 19 mar. 2023.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, n.8, p.1489-1505, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00156-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00156-8). Acesso em: 8 mar. 2023.

FISSORE, R.A.; KUROKAWA, M.; KNOTT, J.; ZHANG, M.; SMYTH, J. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. **Reproduction**, v.124, n.6, p.745-754, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/rep.0.1240745>. Acesso em: 2 mar. 2023.

FRY, R.C.; KELLY, J.M.; HARRIS, S.G.; EARL, C.R. No difference in embryo production from oocytes collected by ovum pick-up from commercial cows when using either hepes or bicarbonate-buffered IVM media. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.353, 2000.

GAMARRA, G.; PONSART, C.; LACAZE, S.; LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. *et al.* Dietary propylene glycol and in vitro embryo production after ovum pick-up in heifers with different anti-Müllerian hormone profiles. **Reproduction, Fertility and Development**, v.27, n.8, p.1249-1261, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/rd14091>. Acesso em: 15 mar. 2023.

GARNER, D.L.; EVANS, K.M.; SEIDEL Jr., G.E.; Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. In: Carrell, D.; Aston, K. (eds) **Spermatogenesis. Methods in Molecular Biology**, v.927. Humana Press, Totowa, NJ, 2013. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0_26. Acesso em: 13 mar. 2023.

GILCHRIST, R.B.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of *cumulus cell* function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v.14, n.2, p.159-177, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm040>. Acesso em: 14 abr. 2023.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2002, 340p.

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.212-217, 2007. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/212.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2023.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2ª ed. São Paulo. Editora Roca, 2008, 408p.

GONG, J.G.; BAXTER, G.; BRAMLEY, T.A.; WEBL, R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose–response study. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.110, n.1, p.91-97, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1100091>. Acesso em: 18 mar. 2023.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. 2.ed. Cambridge: University Press, 2003. 548p.

GROSS, N.; KROPP, J.; KHATIB, H. MicroRNA signaling in embryo development. **Biology**, v.6, n.3, p.1-22, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390%2Fbiology6030034>. Acesso em: 13 mar. 2023.

GUEMRA, S.; MONZANI, P.S.; SANTOS, E.S.; ZANIN, R.; OHASHI, O.M. *et al.* Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.6, p.1616-1624, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000600005>. Acesso em: 13 mar. 2023.

GUIMARÃES, A.L.S.; PEREIRA, S.A.; LEME, L.O.; DODE, M.A.N. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v.83, n.1, p.52–57, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.042>. Acesso em: 15 mar. 2023.

GUTIÉRREZ-REINOSO, M.A.; AGUILERA, C.J.; NAVARRETE, F.; CABEZAS, J.; CASTRO, F.O. *et al.* Effects of extra-long-acting recombinant bovine FSH (bscrFSH) on cattle superovulation. **Animals**, v.12, n.2, p.153, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani12020153>. Acesso em: 20 mar. 2023.

GUTIÉRREZ-REINOSO, M.A.; ARRESEIGOR, C.J.; DRIEDGER, B.; CABEZAS, I.; HUGUES, F. *et al.* Effects of recombinant FSH (bscrFSH) and pituitary FSH (FSH-p) on embryo production in superovulated dairy heifers inseminated with unsorted and sex-sorted semen. **Animal Reproduction Science**, v.252, p.107226, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107226>. Acesso em 20 mar 2023.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.

HASLER, J.F.; BARFIELD, J.P. *In vitro* fertilization. In: R.M. Hopper (Ed.) **Bovine Reproduction**, Wiley & Sons, Hoboken NJ, pp.758–770, 2015.

HIDALGO, C.O.; GÓMEZ, E.; PRIETO, L.; DUQUE, P.; GOYACHE, F. *et al.* Pregnancy rates and metabolic profiles in cattle treated with propylene glycol prior to embryo transfer. **Theriogenology**, v.62, n.3-4, p.664-676, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.11.006>. Acesso em: 25 mar. 2023.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLENSSEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, n.1, p.23-32, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00336-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00336-6). Acesso em: 13 mar. 2023.

KARL, K.R.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; GIBBINGS, E.; IRELAND, J.L.; CLARK, Z.L. *et al.* Negative impact of high doses of follicle-stimulating hormone during superovulation on the ovulatory follicle function in small ovarian reserve dairy heifers. **Biology of Reproduction**, v.104, n.3, p.695-705, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa210>. Acesso em: 13 mar. 2023.

KAUFFOLD, J.; AMER, H.A.H.; BERGFELD, U.; WEBER, W.; SOBIRAJ, A. The in vitro developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. **Journal of Reproduction and Development**, v.51, n.3, p.325-332, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1262/jrd.17002>. Acesso em: 13 mar. 2023.

KAWAMOTO, T.S.; ZACARIAS, T.A.; GUIMARÃES, A.L.S.; SCALIANTE, J.R.; RODRIGUES, S.A.D. *et al.* Serum FSH, AMH related to number and morphology of oocytes in superovulated 4 to 7 months old Nelore breed females (*Bos taurus indicus*). **Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)**; Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil, 2017. Abstracts. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/164464/1/Figueiredo-R.-A.-SBTE-20171.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2023.

KOSARIC, N.; KIWANUKA, H.; GURTNER, G.C. Stem cell therapies for wound healing. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v.19, n.6, p.575-585, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1596257>. Acesso em: 11 abr. 2023.

KREBSBACH, P.H.; VILLA-DIAZ, L.G. The role of integrin $\alpha 6$ (CD49f) in stem cells: more than a conserved biomarker. **Stem Cells and Development**, v.26, n.15, p.1090-1099, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0319>. Acesso em: 21 mar. 2023.

LAMY, J.; CORBIN, E.; BLACHE, M.C.; GARANINA, A.S.; UZBEKOV, R. *et al.* Steroid hormones regulate sperm-oviduct interactions in the bovine. **Reproduction**, v.154, n.4, p.497-508, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/rep-17-0328>. Acesso em: 17 mar. 2023.

LANDRY, D.A.; BELLEFLEUR, A.M.; LABRECQUE, R.; GRAND, F.X.; VIGNEAULT, C. *et al.* Effect of cow age on the in vitro developmental competence of oocytes obtained after FSH stimulation and coasting treatments. **Theriogenology**, v.86, n.5, p.1240-1246, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.064>. Acesso em: 13 mar. 2023.

LANDRY, D.A.; SIRARD, M.A. Follicle capacitation: a meta-analysis to investigate the transcriptome dynamics following follicle-stimulating hormone decline in bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v.99, n.4, p.877-887, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biolre/iyoy090>. Acesso em: 13 mar. 2023.

LAZZARI, G.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; CROTTI, G.; TURINI, P. *et al.* Short-term and long-term effects of embryo culture in the surrogate sheep oviduct versus in vitro culture for different domestic species. **Theriogenology**, v.73, n.6, p.748-757,

2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.08.001>. Acesso em: 14 mar. 2023.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **Journal of Animal Science**, v.48, n.1, p.76-86, 1979. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/jas1979.48176x>. Acesso em: 16 mar. 2023.

LEQUARRE, A.S., VIGNERON, C., RIBAUOUR, F., HOLM, P., DONNAY, I. *et al.*, Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. **Theriogenology**, v.63, n.3, p.841-859, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.015>. Acesso em: 14 mar. 2023.

LI, S.; WINUTHAYANON, W. Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. **Journal of Endocrinology**, v.232, n.1, p.R1–R26, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/joe-16-0302> Acesso em: 19 mar. 2023.

LIMA, J.M.P.; SANTOS, F.A.; PIMENTEL, M.M.L.; BEZERRA, M.B. Progresso metodológico e sua influência na produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.38, n.3, p.135-140, 2014. Disponível em: [http://cba.org.br/pages/publicacoes/rbra/v38n3/pag135-140%20\(RB509\).pdf](http://cba.org.br/pages/publicacoes/rbra/v38n3/pag135-140%20(RB509).pdf). Acesso em: 13 mar. 2023.

LIU, X.; HU, T.; SUN, W.; HAO, H.; LIU, Y. *et al.* Comparison of the developmental competence and quality of bovine embryos obtained by in vitro fertilization with sex-sorted and unsorted semen from seven bulls. **Livestock Science**, v.181, p.263-270, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.09.009>. Acesso em: 15 mar. 2023.

LODDE, V.; BARROS, R.G.; DALL'ACQUA, P.C.; DIECI, C.; ROBERT, C. *et al.* Zinc supports transcription and improves meiotic competence of growing bovine oocytes. **Reproduction**, v.159, n.6, p.679-691, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/rep-19-0398>. Acesso em: 15 mar. 2023.

LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of oocytes in vitro. **Annual Review of Animal Biosciences**, v.4, p.255-268, 2016. Disponível em: Acesso em <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110822>. Acesso em: 14 mar. 2023.

LOPES, J.S.; CANHA-GOUVEIA, A.; PARÍS-OLLER, E.; COY, P. Supplementation of bovine follicular fluid during in vitro maturation increases oocyte cumulus expansion, blastocyst developmental kinetics, and blastocyst cell number. **Theriogenology**, v.126, n.1, p.222-229, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.010>. Acesso em: 13 mar. 2023.

LUEDKE, F.E.; LAVACH, F.L.; CASSANTA, F.G.; NUNES, L.F.N.; SCHLOTEFELD, C. *et al.* Aspectos da produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil – revisão. **Pesquisa agropecuária gaúcha**, v.25, n.1/2, p.120-132, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.36812/pag.2019251/2120-132>. Acesso em: 10 abr. 2023.

LUSTOSA, A.; BARBOZA, N.A.; BARBOSA, Y.G.S.; RODRIGUES, P.K. O.; MAGALHÃES NETO, F.C.R. Aspectos relevantes na produção comercial de

embriões bovinos por meio da técnica biotecnológica de fertilização *in vitro*: Revisão. **Pubvet**, v.12, n.3, p.1-6, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.22256/pubvet.v12n3a51.1-6>. Acesso em: 7 abr. 2023.

MALARD, P.F.; PEIXER, M.A.S.; GRAZIA, J.G.; BRUNEL, H.S.S.; FERES, L.F. *et al.* Intraovarian injection of mesenchymal stem cells improves oocyte yield and in vitro embryo production in a bovine model of fertility loss. **Scientific Reports**, v.10, n.1, p.1-12, 2020. Disponível em: <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6031f7783717068b4607>. Acesso em: 22 mar. 2023.

MAPLETOFT, R.J.; GARCÍA GUERRA, A.; DIAS, F.C.F.; SINGH, J.; ADAMS, G.P. In vitro and in vivo embryo production in cattle superstimulated with FSH for 7 days. **Animal Reproduction**, v.12, n.3, p.383-388, 2015. Disponível em: <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6031f7783717068b4607>. Acesso em: 18 mar. 2023.

MARX, C.; SILVEIRA, M.D.; NARDI, N.B. Adipose-derived stem cells in veterinary medicine: characterization and therapeutic applications. **Stem Cells and Development**, v.24, n.7, p.803-813, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0407>. Acesso em: 13 mar. 2023.

MELLO, R.R.C; FERREIRA, J.E.; SOUSA, S.L.G.; MELLO, M.R.B.; PALHANO, H.B. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.40, n.2, p.58-64, 2016. 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). Acesso em: 15 mar.2023.

MERMILLOD, P.; TOMANEK, M.; MARCHAL., R., MEIJER, L. High developmental competence of cattle oocytes maintained at the germinal vesicle stage for 24 hours in culture by specific inhibition of MPF kinase activity. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, n.1, p.89-95, 2000. Disponível em: [10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200001\)55:1<89::AID-MRD12>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200001)55:1<89::AID-MRD12>3.0.CO;2-M). Acesso em: 15 mar. 2023.

MERTON, J.S.; ROOS, A.P.W., MULLAART, E.; RUIGH, L.; KAAL, L. *et al.* Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v.59, n.2, p.651-674, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01246-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01246-3). Acesso em: 12 mar. 2023.

MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, v.19, n.1, p.55-81, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(83\)90124-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(83)90124-3). Acesso em: 20 mar. 2023.

MONTEIRO, F.M; BATISTA, E.O.S.; VIEIRA, L.M.; BAYEUX, B.M.; ACCORSI, M. *et al.* Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. **Theriogenology**, v.90, n.1, p.54-58, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.002>. Acesso em: 13 mar. 2023.

MOTA, L.H.C.M.; BRANCO, M.A.C.; CARVALHO, Y.N.T.; EVANGELISTA, L.S.M.; CORREIA, H.S. *et al.* Influência da somatotropina recombinante bovina (rbST) na produção *in vitro* de embriões em vacas leiteiras: uma revisão. **Pubvet**, v.6, n.32, art-1456, 2012. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/724a/1d1564f64e59fe824a0a28f2cfc30db637fb.pdf>. Acesso em: 9 abr. 2023.

NAGANO, A.Y.; WEISS, R.R.; BÜCHELE, J.M.; MURADAS, P.R.; GRANEMANN, L.C. A somatotropina bovina recombinante (rbST) na superovulação de fêmeas bovinas. **Archives of Veterinary Science**, v.9, n.2, p.101-106, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v9i2.4072>. Acesso em: 17 mar. 2023.

NIELSEN, N.I.; INGVARTSEN, K.L. Propylene glycol for dairy cows. A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. **Animal Feed Science and Technology**. v.115, n.3-4, p.191-213, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.03.008>. Acesso em: 18 abr. 2023.

NIVET, A.L.; BUNEL, A.; LABRECQUE, R.; BELANGER, J.; VIGNEAULT, C. *et al.* FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. **Reproduction**, v.143, n.2, p.165-171, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/REP-11-0391>. Acesso em: 13 mar. 2023.

OLMEDO-MORENO, L.; AGUILERA, Y.; BALIÑA-SÁNCHEZ, C.; MARTÍN-MONTALVO, A. *et al.* Heterogeneity of *in vitro* expanded mesenchymal stromal cells and strategies to improve their therapeutic actions. **Pharmaceutics**, v.14, n.5, p.1112, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14051112>. Acesso em: 18 abr. 2023.

ONG, W.K.; SUGII, S. Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.45, n.6, p.1083-1086, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.013>. Acesso em: 13 mar. 2023.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, n.2, p.209-222, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90231-F](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90231-F). Acesso em: 14 mar. 2023.

PARRISH, J.J. Bovine *in vitro* fertilization: *in vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, v.81, n.1, p.67-73, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.005>. Acesso em: 13 mar. 2023.

PENITENTE FILHO, J.M.; OLIVEIRA, F.A.; JIMENEZ, C.R.; TORRES, C.A.A. Produção de embriões bovinos *in vivo* e *in vitro*. In: **Anais da 83a Semana do Fazendeiro**, Universidade Federal de Viçosa, 2012. Disponível em: [10.13140/2.1.3981.7928](https://doi.org/10.13140/2.1.3981.7928). Acesso em: 14 mar. 2023.

PÉREZ-SANDOVAL, L.; DUBEIBE-MARÍN, D.; CHÁVEZ-RODRÍGUEZ, A.; GARCÍA-JIMÉNEZ, J.; VELASCO-ACOSTA, D. Superovulatory response in Brahman donor cows using follicular ablation before superovulation protocols. **Revista MVZ**

Córdoba, v.24, n.2, p.7203-7208, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21897/rmvz.1309>. Acesso em: 2 abr. 2023.

PIETERSE, M.C.; KAPPEN, K.A.; KRUIP, Th.A.M.; TAVERNE, M.A.M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v.30, n.4, p.751-762, 1988. Disponível em: 10.1016/0093-691x(88)90310-x. Acesso em: 13 de março de 2023.

QUEIRÓZ, F.M.; ANDREAZZI, M.A.; CAVALIERI, F.L.B.; EMANUELLI, I.P.; SENEDA, M.M. *et al.* Ovarian superstimulation with FSH in Wagyu breed bovine donors impacts follicular dynamics but does not improve the amount of embryos. **Research, Society and Development**, v.10, n.10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i10.18811>. Acesso em: 13 mar. 2023.

RADCLIFF, R.P.; VANDEHAAR, M.J.; KOBAYASHI, Y.; SHARMA, B.K.; TUCKER, H.A. *et al.* Effect of dietary energy and somatotropin on components of the somatotrophic axis in Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v.87, n.5, p.1229-1235, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(04\)73273-7](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(04)73273-7). Acesso em: 19 mar. 2023.

REZENDE, R.G. Efeitos da infusão ruminal de propilenoglicol sobre os parâmetros metabólicos e a produção *in vitro* de embriões de vacas holandesas. 2019. 85p. **Tese de doutorado – Universidade de São Paulo**. Departamento de Reprodução Animal, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.10.2020.tde-10122019-111854>. Acesso em: 11 abr. 2023.

RIBEIRO, L.G.M. **Efeito da somatotropina bovina recombinante (RBST) sobre a produção e maturação *in vitro* de oócitos bovinos da raça Sindi**. 2018. 69p. Dissertação elaborada para defesa de mestrado em Ciência Animal. Universidade Federal do Vale do São Francisco, Pernambuco. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/porta1/resource/pt/vtt-215178>. Acesso em: 07 abr. 2023.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular reproduction and development**, v.61, n.2, p.234-248, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.1153>. Acesso em: 13 mar. 2023.

RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PÉREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M.P. *et al.* Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction** v.68, n.1, p.236-243, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007799>. Acesso em: 15 mar. 2023.

RIZOS, D.; BURKE, L.; DUFFY, P.; WADE, M.; MEE, J.F. *et al.* Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production *in vitro*. **Theriogenology**, v.63, n.3, p.939–949, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.008>. Acesso em: 13 abr. 2023.

RIZOS, D.; KENNY, D.A.; GRIFFIN, W.; QUINN, K.; DUFFY, P. *et al.* The effect of feeding propylene glycol to dairy cows during the early postpartum period on follicular dynamics and on metabolic parameters related to fertility. **Theriogenology**, v.69, n.6, p.688–699, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.12.001>. Acesso em: 13 mar. 2023.

RIZOS, D.; RAMIREZ, M.A.; PINTADO, B.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Culture of bovine embryos in intermediate host oviducts with emphasis on the isolated mouse oviduct. **Theriogenology**, v.73, n.6, p.777-785, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.001>. Acesso em: 13 mar. 2023.

RODRIGUES, C.F.M.; GARCIA, J.M. Fecundação *in vitro*: aplicação comercial. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.28, n.1, p.186-187, 2000.

RUBIN, M.I.B.; PESSOA, G.A.; FRAGA, D.R.; VASCONCELOS, F.F.; SILVA, C.A.M. Produção *in vitro* de embriões e Clonagem: um caminho conhecido?. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl n.6, p.77-85, 2009. Disponível em: <http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/p77-85.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2023.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, suplemento especial, p.229-233, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982007001000021>. Acesso em: 15 mar.2023.

SÁ FILHO, M.F.; CARVALHO, N.A.T.; GIMENES, L.U.; TORRES-JÚNIOR, J.R.; NASSER, L.F.T. *et al.* Effect of recombinant bovine somatotropin (bST) on follicular population and on *in vitro* buffalo embryo production. **Animal Reproduction Science**, v.113, n.1-4, p.51-59, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.06.008>. Acesso em: 10 mar. 2023.

SANTOS, S.S.D.; DANTAS, J.K.; MIRANDA, M.S.; BIONDI, F.C.; OHASHI, O.M. Cinética da maturação nuclear *in vitro* de oócitos bubalinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.5, p. 266- 270, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-95962002000500009>. Acesso em: 9 abr. 2023.

SEIDEL Jr., G.E. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. **Theriogenology**, v.59, n.2, p.585-598, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)01242-6](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)01242-6). Acesso em: 13 mar. 2023.

SEIDEL Jr., G.E.; SCHENK, J.L. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. **Animal Reproduction Science**, v.105, n.1-2, p.129–138, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.015>. Acesso em: 12 mar. 2023.

SILVA, J.C.C.; ALVAREZ, R.H.; ZANENGA, C.A.; PEREIRA, G.T. Factors affecting embryo production in superovulated Nelore cattle. **Animal Reproduction**, v.6, n.3, p.440-445, 2009. Disponível em: <http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v6n3/AR226%20Silva%20pag440-445.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2023.

SILVA, J.S.; BORGES, L.S.; MARTINS, L.E.L.L.; LIMA, L.A.; BARBOSA, Y.G.S. *et al.* Aspectos comerciais da transferência de embriões e fertilização *in vitro* em bovinos -revisão. **Revista Eletrônica Nutri Time**, v.12, n.5, p.4316-4319, 2015. Disponível em: <https://nutritime.com.br/wp-content/uploads/2020/02/Artigo-332.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2023.

SILVA, R.R.; VULCANI, V.A.S.; CAMARGOS, A.S.; COSTA, U.R.; DUTRA, M.M. *et al.* Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte. In **Colloquium Agrariae**, v.13, n. Especial, p.402-415, 2017. Disponível em: [10.5747/ca.2017.v13.nesp.000244](https://doi.org/10.5747/ca.2017.v13.nesp.000244). Acesso em: 9 abr. 2023.

SIRARD, M.A.; LAMBERT, R.D.; BELAND, R. *et al.* The effects of repeated laparoscopic surgery used for ovarian examination and follicular aspirariona in cows. **Animal Reproduction Science**, v.9, n.3, p.25-30, 1985. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(85\)90038-7](https://doi.org/10.1016/0378-4320(85)90038-7). Acesso em: 12 mar. 2023.

SIRARD, M.A.; PARRISH, J.J.; WARE, C.B.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; FIRST, N.L. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. **Biology of Reproduction**, v.39, n.3, p.546-552, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod39.3.546>. Acesso: 16 abr. 2023.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, n.1, p.126-136, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.020>. Acesso em: 12 mar. 2023.

SIRARD, M.A. Factors affecting oocyte and embryo transcriptomes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, suppl.4, p.148-155, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02069.x>. Acesso em: 13 mar. 2023.

SMITZ, J.; NOGUEIRA, D.; VANHOUTTE, L.; MATOS, D.G.; CORTVRINDT, R.N. Oocyte *in vitro* maturation. In: GARDNER, D.K.; WEISSMAN, A.; HOWLES, C.M.; SHOHAM, Z. (Eds.). **Textbook of Assisted Reproductive Techniques**, 2 ed. Taylor & Francis Group, London, pp.125-161, 2004.

SOARES, J.G.; ROSSI, G.F.; BAYEUX, B.M.; MORAES, G.F.A.; ELLIFF, F.M. *et al.* Effect of stem cells application on the oocyte and embryo production of bovine females. **Animal Reproduction**, v.15, n.3, p.521, 2018. Disponível em: <https://www.animal-reproduction.org/article/5b76d8500e882551198068a9/pdf/animreprod-15-3-507.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2023.

SOLLECITO, N.V.; PEREIRA, E.C.M.; GRÁZIA, J.G.V.; NEVES, B.P.; COUTO, B.V.R. *et al.* Atividade antioxidante de óleo essencial obtido de *Lippia origanoides* melhora a qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71, n.3, p.723-731, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10323>. Acesso em: 14 mar. 2023.

SOMFAI, T.; NAKAI, M.; TANIHARA, F., NOGUCHI, J., KANEKO, H. *et al.* Comparison of ethylene glycol and propylene glycol for the vitrification of immature

porcine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v.59, n.4, p.378-384, 2013. Disponível em: [10.1262/jrd.2013-015](https://doi.org/10.1262/jrd.2013-015). Acesso em: 14 mar. 2023.

SONG, D.; ZHONG, Y.; QIAN, C.; ZOU, Q.; OU, J.; SHI, Y. *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells therapy in cyclophosphamide-induced premature ovarian failure rat model. **BioMed Research International**, v.2016, article ID 2517514, 13p., 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2517514.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2023.

SOUZA, N.S.; ABADE, C.C. Produção *in vitro* de embriões bovinos: etapas de produção e histórico no Brasil. **Ciência Veterinária UNIFIL**, v.1, n.3, p.95-108, 2018. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n1/p13-17%20\(RB741\).pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n1/p13-17%20(RB741).pdf) Acesso em: 14 abr. 2023.

SOUZA, A.C.C.; COSTA, C.B.; DA SILVA, C.B.; BERGAMO, L.Z.; MOROTTI, F. *et al.* Influência da contagem de folículos antrais na produção *in vitro* de embriões bovinos de doadoras *Bos indicus* e *Bos taurus* – revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.43, n.1, p.13-17, 2019. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n1/p13-17%20\(RB741\).pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n1/p13-17%20(RB741).pdf). Acesso em: 18 abr. 2023.

SRINGARM, K.; THONGKHAM, M.; MEKCHAY, S.; LUMSANGKUL, C.; THAWORN, W. *et al.* High-efficiency bovine sperm sexing used magnetic-activated cell sorting by coupling scFv antibodies specific to Y-chromosome-bearing sperm on magnetic microbeads. **Biology**, v.11, n.5, p.715, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/biology11050715>. Acesso em: 11 mar. 2023.

STAIGMILLER, R.B.; MOOR, R.M. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. **Gamete Research**, v.9, n.2, p.221-229, 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.1120090211>. Acesso em: 14 mar. 2023.

STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G. Birth after reimplantation of a human embryo. **Lancet**, v.312, n.8085, p.366, 1978. Disponível em: [10.1016/s0140-6736\(78\)92957-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(78)92957-4). Acesso em: 14 mar. 2023.

STRINGFELLOW, D.A; SEIDEL, S.M. **Manual of the International Embryo Transfer Society: A Procedural Guide and General Information for the Use of Embryo Transfer Technology Emphasizing Sanitary Procedures**. 3rd Edition, International Embryo Transfer Society, Savory, IL, 1998.

TANEJA, M.; BOLS, P.E.; VAN DE VELDE, A.; JU, J.C.; SCHREIBER, D. *et al.* Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of Reproduction**, v.62, n.1, p.206-213, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.1.206>. Acesso em: 18 mar. 2023.

TRIPATHI, S.K.; NANDI, S.; GUPTA, P.S.P.; MONDAL, S. Antioxidants supplementation improves the quality of in vitro produced ovine embryos with amendments in key development gene expressions. **Theriogenology**, v.201, p. 41-

52, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.11.048>. Acesso em: 15 mar. 2023.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J; JACOBSEN, H. *et al.* Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, n.1, p.53-58, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)10982795\(199809\)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)10982795(199809)51:1<53::AID-MRD6>3.0.CO;2-V). Acesso em: 13 mar. 2023.

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. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.100-109, 2008. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB152%20Varago%20pag100-109.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2023.

VIANA, J.H.M.; BOLS, P.E.J. Variações biológicas associadas a recuperação de complexos *cumulus-oócitos* por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, Supl.1, p.1-4, 2005. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/930396/1/Variaveis-biologicas-associadas-a-recuperacao-de-complexos-cumulus-oocito.pdf>. Acesso em: 18 mar. 2023.

VIANA, J.H.M. Classificação de embriões bovinos produzidos *in vivo*. Embrapa Gado de Leite. **Comunicado Técnico**, 59. 4p. 2009. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/65449/1/COT-59-Classificacao-de-embrioes.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2023.

VIANA, J.H.M. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals Divergent trends for IVD and IVP embryos. **Embryo Technology Newsletter**, v.39, n.4, p.1-14, 2021. Disponível em: https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2020.pdf. Acesso em: 14 mar. 2023.

VIANA, J.H.M. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, v.40, n.4, p.1-19, 2022. Disponível em: https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2021.pdf. Acesso em: 14 mar. 2023.

VIEIRA, L.M.; RODRIGUES C.A.; CASTRO NETTO, A.; GUERREIRO, B.M.; SILVEIRA, C.R.A. *et al.* Efficacy of a single intramuscular injection of porcine FSH in hyaluronan prior to ovum pick-up in Holstein cattle. **Theriogenology**, v.85, n.5, p.877-886, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.036>. Acesso em: 14 mar. 2023

WANI, N.A.; WANI, G.M.; KHAN, M.Z.; SALAHUDIN, S. Effect of oocyte harvesting techniques on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization in sheep. **Small Ruminant Research**, v.36, n.1, p.63-67, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.06.002>. Acesso em: 23 mar. 2023.

WATANABE, Y.F.; SOUZA, A.H.; MINGOTI, R.D.; FERREIRA, R.M.; BATISTA, E.O.S. *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://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR1008>. Acesso em: 15 mar. 2023.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z. Impact of heat stress on cow reproduction and fertility. **Animal Frontiers**, v.9, n.1, p.32-38, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/af/vfy027>. Acesso em: 17 abr. 2023.

WRENZYCKI, C. Sistemas de cultivo *in vitro*: quão longe estamos das condições ideais? **Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, p.155-159, 2016. Disponível em: <https://www.sbte.org.br/arquivos/anais/anais-2016.pdf#page=155>. Acesso em: 18 mar. 2023.