

ASPECTOS TÉCNICOS DA PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA *IN VITRO* BOVINA: REVISÃO DE LITERATURA

Lígia Nolasco Garcia
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Letícia Ferrari Crocomo
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões é uma biotécnica da reprodução assistida que consiste no co-cultivo dos gametas femininos e masculinos e do zigoto oriundo da fecundação até a etapa de blastocisto em ambiente laboratorial. Envolve, portanto, desde a coleta dos oócitos até a maturação oocitária, fecundação e cultivo embrionário *in vitro*. É uma ferramenta muito eficaz para melhorar a eficiência produtiva e reprodutiva dos rebanhos, sendo aplicável, inclusive, em animais que não se encontram mais aptos a reprodução pelos métodos convencionais. Nesse contexto, a técnica é capaz de gerar ganho genético muito rápido e superior as demais biotécnicas por possibilitar a disseminação da genética melhoradora materna e paterna. O emprego desta biotécnica tem crescido exponencialmente no Brasil e no mundo, liderando o ranking na produção de embriões. Contudo, apesar de amplamente difundida, a proporção de oócitos que alcançam o estágio de blastocisto e geram prenhez ainda é baixa em comparação ao o que ocorre *in vivo*. Portanto, objetiva-se com esta revisão realizar uma abordagem atualizada dos principais aspectos implicados nas etapas da produção *in vitro* de embriões em bovinos.

Palavras-chave: Oócito, Embrião, Fecundação, Maturação, Cultivo.

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos teve seu marco inicial na década de 80, quando, em 1982, nasceu o primeiro bezerro fruto da técnica (Brackett *et al.*, 1982). No Brasil, a partir de 2010, a PIVE teve um crescimento exponencial (Viana *et al.*, 2017) e, em 2011, dos 350.762 embriões bovinos produzidos, 90,7% foram *in vitro* (Viana, 2012). Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor no mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (Viana, 2021).

A PIVE é uma ferramenta muito eficaz no melhoramento genético dos rebanhos, possibilitando a disseminação de genética melhoradora com consequente incremento da eficiência produtiva e reprodutiva (Baruselli *et al.*, 2019). A técnica envolve desde a coleta dos complexos *cumulus*-oócitos (COCs) imaturos por punção ou aspiração do ambiente folicular, seguida pela maturação e fertilização *in vitro* dos mesmos. Os embriões obtidos são cultivados *in vitro* em meios específicos para posterior congelamento e transferência para fêmeas receptoras aptas a conceber (Rizos *et al.*, 2008).

A execução da técnica é possível tanto em animais saudáveis quanto naqueles que, por técnicas convencionais, não se encontram mais aptos a reprodução em decorrência de alterações sem caráter hereditário. Fêmeas com poucos meses de idade, gestantes até o terceiro mês, ou ainda no período voluntário de espera após o parto podem ser doadoras (Silva *et al.*, 2015). Diante da relevância da técnica, este trabalho de revisão tem o objetivo de apresentar de maneira atualizada os principais aspectos implicados nas etapas da PIVE em bovinos.

DESENVOLVIMENTO

Coleta dos complexos *cumulus*-oócitos (COCs)

A recuperação oocitária para a PIVE pode ser realizada *post mortem*, por meio da punção folicular de ovários de abatedouro, ou *in vivo*, por meio de diversas técnicas como: laparotomia, laparoscopia ou por aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom – Ovum Pick Up (OPU) (Varago *et al.*, 2008).

A OPU tornou-se a técnica predominante para a coleta de oócitos em bovinos (Moore *et al.*, 2017) e representa cerca de 40% da forma de captação

dos embriões produzidos no mundo (Seneda *et al.*, 2020). Contudo, a coleta de oócitos via laparoscópica (LOPU) vem alcançando maior credibilidade por ser um método eficaz na recuperação oocitária de fêmeas pré-púberes, bezerras de 2-6 meses de idade, atendendo as demandas de um mercado altamente competitivo, por possibilitar a reprodução extremamente precoce e o uso de marcadores genéticos, gerando um diferencial de seleção (Moore *et al.*, 2017; Baldassarre, 2021).

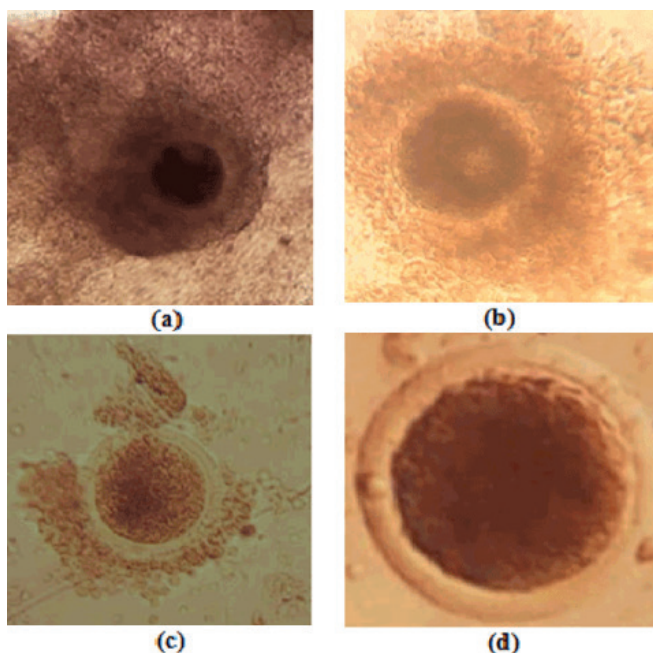
Em todos os cenários, contudo, os oócitos são provindos de um pool heterogêneo de folículos, como dominantes, subordinados e até mesmo atresícos, tanto de ondas ovulatórias quanto não ovulatórias. Normalmente, são aspirados folículos com diâmetros de 2 a 8 mm, pois, folículos ≥ 8 mm já se encontram em atresia ou início da maturação, e os folículos ≤ 2 mm são considerados de baixa qualidade por não terem competência de continuar o desenvolvimento (Gonçalves *et al.*, 2008; Savannah *et al.*, 2023).

O material aspirado é lavado em filtro próprio para retenção das estruturas até que o conteúdo se torne translúcido. O sedimento é transferido para placas de Petri 90mm, para procura, seleção, contagem e avaliação dos oócitos (Loos *et al.*, 1991). A classificação dos oócitos (Classe I, II e III) incluem critérios morfológicos, como a aparência e o número das camadas de células do *cumulus*, além das características citoplasmáticas, como o brilho e a textura do citoplasma (Figura 1).

A classe I refere-se ao oócito mais saudável com citoplasma homogêneo, zona pelúcida bem delimitada e mais de três camadas de células da granulosa compactas. A classe II, possui qualidade intermediária, apresenta cobertura parcial com menos de três camadas de células, podendo ter ligera expansão do *cumulus*. Já a classe III, de pior qualidade, possui citoplasma escuro, núcleo irregular, picnótico, *cumulus* expandido e frouxamente aderido, indicativo de atresia folicular. (WATERS, *et al.*, 2002; ÁGUILA *et al.*, 2020).

Oócitos desnudos não possuem células do *cumulus* ou possuem poucas células, podendo apresentar zona pelúcida irregular e/ou retração e vacuolização do citoplasma. Já o oócito degenerado ou atresíco, se caracteriza pela ausência de células do *cumulus* e citoplasma heterogêneo, sendo desintegrado e reabsorvido *in vivo* (TORRES-JÚNIOR *et al.*, 2008).

Figura 1. Classificação oocitária, (a) Grau I, (b) Grau II, (c) Grau III, (d) Desnudo.



Fonte: KOUAMO *et al.*, 2019.

Maturação *in vitro*

A maturação oocitária é um evento fisiológico imprescindível para o sucesso da fecundação. Nos bovinos, assim como em outros mamíferos, os oócitos iniciam a meiose durante a vida fetal e paralisam a progressão meiótica na fase de diplóteno da prófase I (vesícula germinativa). A retomada da meiose ocorre a partir da puberdade e é novamente bloqueada no estágio de metáfase II, caracterizando a maturação nuclear, com extrusão do primeiro corpúsculo polar. No momento da fecundação acontece estímulo para finalização da meiose II e o segundo corpúsculo polar ou polócito é extrusado (Pinus *et al.*, 1935).

Além da maturação nuclear, o oócito também sofre maturação citoplasmática, que inclui a redistribuição das organelas celulares como os grânulos corticais e migração de mitocôndrias, desenvolvimento de mecanismos regulatórios de cálcio, obtenção da competência para o bloqueio da polispermia, entre outros eventos importantes para dar suporte ao desenvolvimento embrionário (Anguita *et al.*, 2007; Picton *et al.*, 1998).

A maturação nuclear, *in vitro*, inicia imediatamente após a retirada do oócito do ambiente folicular com interrupção do contato com as células foliculares (Varago *et al.*, 2008) e leva de 20 a 24 horas para se completar em condição adequada. A maturação citoplasmática, contudo, é um processo mais lento, ocorrendo ao longo do desenvolvimento folicular, com o crescimento do oócito (Watson, 2007).

Durante este processo, as células da granulosa e do *cumulus* expressam genes específicos necessários para sua diferenciação terminal. As células do *cumulus* produzem e secretam ácido hialurônico, responsável por realizar a expansão celular, e incorporar as células em uma matriz mucinosa, sendo este o principal aspecto que sinaliza a maturação oocitária (Figura 2), em decorrência do estímulo hormonal e das condições adequadas de cultivo (Richards *et al.*, 2002; Sasseville *et al.*, 2009).

Figura 2. Oócitos após maturação *in vitro* caracterizados pela expansão das células do *cumulus*.



Fonte: Autora (2022).

A incompatibilidade desses eventos de maturação *in vitro* podem acarretar danos no desenvolvimento embrionário. Nesse contexto, o bloqueio farmacológico da retomada da meiose, mantendo os ovócitos na fase de vesícula germinativa em cultura, pode ser benéfico por permitir sua diferenciação antes da retomada meiótica (Ferré *et al.*, 2020).

Existem diversos meios de maturação *in vitro* (MIV) para embriões bovinos, porém, o Tissue Culture Medium 199 (TCM 199®) é o mais difundido. O TCM 199® é comumente suplementado com vitaminas, antibióticos, bicarbonato de sódio,

aminoácidos como L-glutamina, soro fetal bovino (SFB), estradiol-17 β , FSH, LH, lactato e piruvato de sódio. Além do meio próprio, a MIV requer ambiente controlado, sendo necessário estufa que mantenha temperatura, umidade saturada e atmosfera gasosa contendo 5% de CO₂ (Gandhi *et al.*, 2000; Smetanina *et al.*, 2000; Varago *et al.*, 2008).

Fertilização *in vitro*

A fecundação *in vitro* (FIV) é um processo que, por meio da incubação de oócitos maturados com espermatozoides capacitados em meio próprio, acontece fusão das membranas e emparelhamentos dos pró-núcleos, originando um zigoto (Oliveira *et al.*, 2014). *In vivo*, a fecundação ocorre na ampola da tuba uterina, e durante o trajeto dentro do útero, o espermatozoide sofre mudanças bioquímicas devido a substâncias do trato reprodutivo feminino, caracterizando a capacitação espermática e possibilitando a reação acrossômica. Já *in vitro*, é necessário fornecer meio e ambiente adequado para ocorrer a capacitação, além de favorecer o metabolismo dos oócitos (Gonçalves *et al.*, 2007).

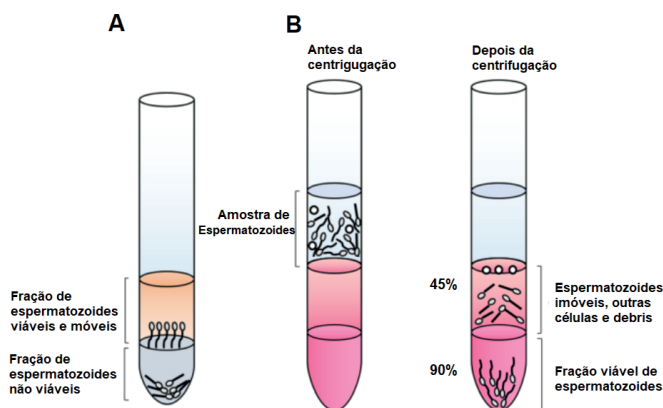
O preparo dos espermatozoides acontece por meio de procedimentos de centrifugação por imersão ou por gradiente de diferentes densidades para remover os crioprotetores usados no congelamento, detritos, plasma seminal e espermatozoides mortos, restando apenas a fração móvel (Ferré *et al.*, 2020). Dentre os principais métodos usados para o preparo dos espermatozoides, destacam-se: swim-up, swim-down (técnica do sedimento), filtração em coluna de lã de vidro, lavagem mediante centrifugação, separação por gradiente descontínuo de BSA e separação por gradiente descontínuo de Percoll (Coelho *et al.*, 2000). Contudo há uma preferência pelas técnicas de separação fundamentadas na capacidade de migração do próprio espermatozoide (Freitas-DellAqua *et al.*, 2009).

O Percoll é um meio amplamente difundido, baseado na separação de células e partículas subcelulares em meio de gradientes de densidade. Ele é composto de partículas de sílica coloidal revestidas com polivinilpirrolidona (PVP) não dialisável que possibilita a separação dos espermatozoides de acordo com a maturidade dos mesmos e integridade de células, bactérias e diluentes. A montagem do Percoll acontece em gradientes de 90% e 45% (Ferré *et al.*, 2020).

A amostra de espermatozoides é depositada sobre esses gradientes e submetida à centrifugação por 5 minutos em 5,5 rpm (rotações por minuto). Os espermatozoides viáveis são obtidos no pellet formado após a centrifugação (Figura 3) e podem ser novamente centrifugados, por mais 3 minutos em 3,3 rpm, na ausência do Percoll, contendo apenas substâncias para limpar e nutrir o sêmen. Contudo, existe um ponto negativo do Percoll que é o efeito endotóxico do PVP (Samardzija *et al.*, 2005).

Existem vários produtos para substituição do Percoll (Folchini *et al.*, 2012; Gonçalves *et al.*, 2012; Arias *et al.*, 2017) e, embora o swim-up seja o método mais antigo, ele ainda é muito usado por ser econômico e de simples execução. Ele se baseia na seleção de espermatozoides móveis que conseguem migrar através da solução swim-up. Neste processo, os espermatozoides são depositados no fundo do tubo falcon, abaixo da solução, formando um pellet. São mantidos nesta condição de 45 minutos até 1 hora, em estufa a 38,5°, em ângulo de 45°. Ao final do processo retira-se, cuidadosamente, o sobrenadante, que é a porção de espermatozoides com motilidade progressiva. Por meio desta técnica é possível obter grande quantidade de gametas móveis sem danos morfológicos (Arias *et al.*, 2017).

Figura 3. Imagem representativa das técnicas de seleção espermática *in vitro*. Técnica de Swim Up; B- Técnica de Separação por Gradiente de Densidade.



Fonte: Adaptado Ramires (2023).

O meio de fecundação *in vitro* Fert-TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato) é o mais usado para a fertilização por conter agentes como: heparina, cálcio ionóforo, hipotaurina, epinefrina, albumina sérica bovina (BSA), e penicilamina (Iritani *et al.*, 1977; Gordon, 2003; Gimenes *et al.*, 2015; Ferré, *et al.*, 2020). A adição de epinefrina e hipotaurina têm o propósito de melhorar o ambiente embrionário e aumentar as chances de sucesso na PIVE, possibilitando a estabilização do pH, proteção contra o estresse oxidativo, promoção do desenvolvimento e melhora da viabilidade embrionária (Miller *et al.*, 1994). A heparina é uma glicosaminoglicana que desencadeia reações bioquímicas na membrana plasmática do espermatozoide agindo como um agente capacitante, assim como o cálcio ionóforo (Assumpção *et al.*, 2002).

O co-cultivo dos gametas é realizado em gotas de 50 a 100 µl em placa de petri por período de 18 a 24 horas (Gordon, 2003) em incubadora umidificada a 38,5°C e 5% CO₂ (Savannah *et al.*, 2023). O número mínimo de espermatozoides necessários por gotas ou por oócitos não é bem definido devido à grande variação individual dos touros e variações entre raças, porém, uma grande vantagem da PIVE é necessitar de um pequeno número de espermatozoides para fertilizar, favorecendo o uso do sêmen sexado (Ferré *et al.*, 2020).

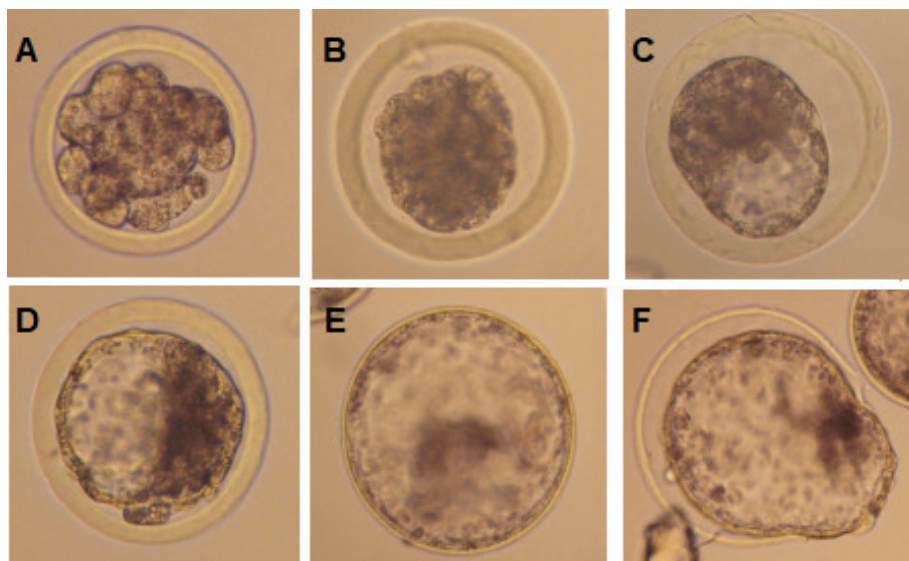
A dose inseminante varia de 5 a 10 µl de sêmen por gota, o que representa uma concentração de 100×10^3 espermatozoides por gota, correspondendo a 5×10^3 espermatozoide por oócito (Oliveira *et al.*, 2014). A taxa de fertilização é avaliada pela clivagem, que ocorre entre 48 ou 72 horas após a inseminação (considerando que não esteja ocorrendo partenogênese), e varia de 70% e 80% dependendo da fertilidade do touro (Ferré *et al.*, 2020).

Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* (CIV), semelhante aos processos de maturação e fecundação, também necessita de um ambiente controlado para o desenvolvimento dos prováveis zigotos. Para isso, a incubadora deve contar com umidade saturada, 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂. O tempo de cultivo apresenta variação de 7 a 9 dias, sendo que no 3º dia é realizada a avaliação da clivagem, no 7º dia a avaliação das taxas de blastocistos produzidos, e no 9º dia a avaliação da taxa de eclosão (Gonçalves *et al.*, 2007; Varago *et al.*, 2009; Savannah *et al.*, 2023).

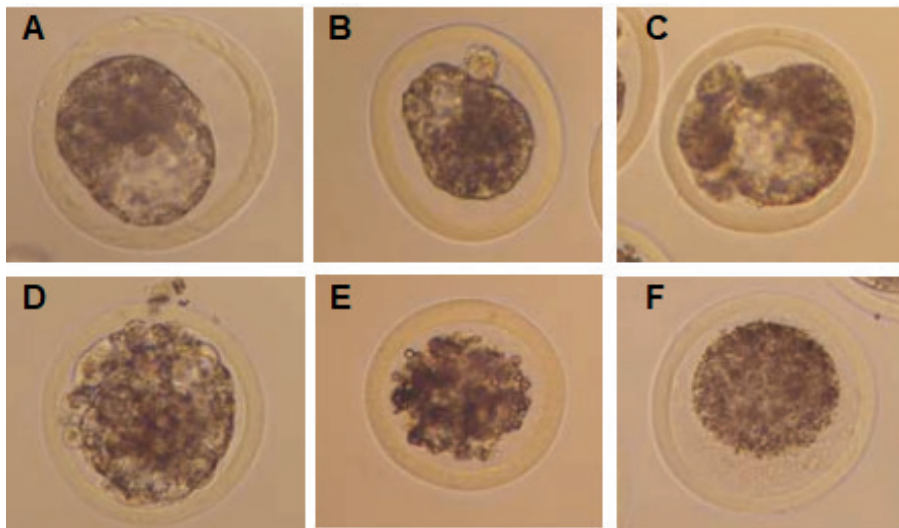
Para avaliar o estágio embrionário, características associadas à progressão do desenvolvimento embrionário são consideradas, sendo elas: tamanho, número e grau de compactação dos blastômeros, formação da blastocele, espessura da zona pelúcida e espaço ocupado pelo botão embrionário. A Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) padronizou os critérios para a classificação morfológica de embriões bovinos. A classificação do estágio de desenvolvimento possui escala de 1 a 9, sendo 1 oócito não fecundado e 9 blastocisto eclodido (Figura 4). Existe também a classificação quanto à qualidade embrionária (Figura 5) onde o código 1 caracteriza embriões de excelente e boa qualidade e o código 4 para embriões degenerados ou mortos (IETS, 1998).

Figura 4. Imagem dos estágios embrionários. A - Mórula (IETS 3), B- Mórula Compacta (IETS 4), C- Blastocisto Inicial (IETS 5), D- Blastocisto (IETS 6), E- Blastocisto Expandido (IETS 7), F- Blastocisto Eclodindo (IETS 8).



Fonte: Adaptado IETS (Stringfellow *et al.*, 1998).

Figura 5. Graus de qualidade embrionária. A – Qualidade excelente (IETS 1) B- Qualidade boa (IETS 1) C- Qualidade regular (IETS 2) D- Qualidade pobre (IETS 3) E- Embriões degenerados (IETS 4) F- Oócitos não fecundados.



Fonte: Adaptado IETS (Stringfellow *et al.*, 1998).

Para cultivo, os presumidos zigotos devem ser despidos das células do *cúmulus* por meio da pipetagem. O meio CIV é a base de fluido ovidutal sintético suplementado com BSA, SFB, antibióticos, aminoácidos e piruvato de sódio (Gimenes *et al.*, 2015). As gotas de cultivo podem abrigar de 20 a 30 estruturas, sendo 25 o número ideal, pois, os embriões prosperam em grupo por trocarem fatores benéficos entre si (Savannah *et al.*, 2023).

Em geral, apenas 20% a 40% dos oócitos cultivados alcançarão o estágio de blastocisto (Rizos *et al.*, 2008), dificilmente ultrapassando taxas de 40% a 50% (LONERGAN *et al.*, 2016). Considerando as taxas de maturação e clivagem esperadas, a média dos oócitos recuperados e maturados *in vitro* que chegam a estágio de blastocisto é baixa (HANSEN, 2020). Falhas na maturação, características intrínsecas e extrínsecas do oócito, além de fatores relacionados ao sêmen, são alguns fatores que implicam nesta baixa produção embrionária. Novos estudos se fazem necessários para determinar a real competência do oócito e os fatores subseqüentes que interferem o desenvolvimento embrionário *in vitro* (Ferré *et al.*, 2020).

Criopreservação

A criopreservação é uma técnica essencial na PIVE pois possibilita o armazenamento de embriões por longos períodos e a utilização em situações de excedente da produção ou escassez de receptoras, além de permitir o comércio de excelente material genético em todo o mundo. Existem dois principais processos de criopreservação embrionária: a vitrificação e o congelamento, e, atualmente, um dos maiores desafios neste âmbito é melhorar a sobrevivência após o aquecimento ou descongelamento (Sanches *et al.*, 2016; Gomez *et al.*, 2020).

O processo de vitrificação (congelamento rápido) não demanda equipamentos, é uma técnica simples e extremamente facilitadora quando o número de embriões a serem congelados é reduzido (Gomez *et al.*, 2020), sendo o método predominante (Dode *et al.*, 2013) de armazenamento embrionário. Ela consiste no uso de soluções de alta osmolaridade para retirar rapidamente a água intracelular, gerando desidratação das células embrionárias e as tornando permeáveis ao crioprotetor. Desta maneira, o embrião é capaz de resistir a imersão no nitrogênio líquido sem formar cristais de gelo no seu interior (Vajta *et al.*, 1998).

O congelamento lento requer uma máquina específica para controlar a taxa de resfriamento mantendo uma curva constante até o momento de imersão no nitrogênio líquido (-196°C). As principais vantagens desta técnica são: o uso de baixos níveis de crioprotetores, uma vez que estes em excesso causam toxicidade embrionária, e a possibilidade de ser transferido de maneira direta na fazenda, ou seja, sem a necessidade de reaquecimento com meios próprios, apenas realizando o descongelamento em banho maria (Sanches *et al.*, 2017; Gomez *et al.*, 2020).

A etapa de criopreservação é um momento desafiador da produção *in vitro* de embriões, e, mesmo havendo avanços nos últimos anos, os resultados ainda são muito variáveis, pois os processos de congelamento e descongelamento afetam inevitavelmente a integridade física e viabilidade do embrião (Sanches *et al.*, 2017; Gomez *et al.*, 2020).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção *in vitro* de embriões atinge patamares cada vez maiores no âmbito mundial da produção embrionária, e, devido aos avanços técnicos das últimas décadas, se tornou a biotecnologia de maior impacto na disseminação de material genético nos rebanhos bovinos. A técnica apresenta-se bem conceituada quanto às suas etapas, contudo, mais estudos são necessários em atendimento as fases mais críticas do processo, envolvendo a maturação oocitária, o cultivo embrionário, e os métodos de criopreservação visando melhores taxas de prenhez.

REFERÊNCIAS

- AGUILA, L. et al. Oocyte Selection for In Vitro Embryo Production in Bovine Species: Noninvasive Approaches for New Challenges of Oocyte Competence. *Animals*, v. 24, n. 10, p. 2196, 2020.
- ANGUITA B. et al. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepuberal goat oocytes. *Theriogenology*, v. 67, p. 526-536, 2007.
- ARIAS, M. et al. Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reproductive Biology*, v. 17, n. 2, p. 126-132, 2017.
- ASSUMPÇÃO, M. et al. Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 39, p. 149-156, 2002.
- BALDASSARRE, H. et al. Coleta laparoscópica de óvulos seguida de produção e transferência de embriões *in vitro* em programas de reprodução assistida para ruminantes. *Animals*, v. 11, p. 216, 2021
- BARUSELLI, P. et al. Estratégias para aumentar a produção de embriões em bovinos. *Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA - 2019)* Gramado, RS, 15 a 17 de maio de 2019.
- BRACKETT, R. et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod*, v. 27, p. 147-158, 1982.
- COELHO, L. et al. Fecundação *in vitro* de ovócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, p. 397- 402, 2000.
- DODE, M. et al. Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 37, p. 145-150, 2013.
- FERRÉ, L. 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.

FOLCHINI, N. et al. Uso de mini-Percoll modificado para seleção e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozoides bovinos. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 36, n. 4, p. 239-244, out./dez. 2012.

FREITAS, V. et al. Transferência de embriões em caprinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*, p. 179-194, 2002.

FREITAS-DELLAQUA, C. et al. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino / Methods of assessments of frozen-thawed bull semen. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 33, n. 4, p. 213-222, 2009.

GANDHI, A. et al. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. *Human Reprod*, v. 15, p. 395-401, 2000.

GIMENES, L. et al. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect in vitro embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*, *Theriogenology*, v. 83, n. 3, p. 385-393, 2015.

KOUAMO J. et al. Evaluation of bovine (*Bos indicus*) ovarian potential preserved at 5°C for in vitro oocyte production in the Adamawa plateau (Cameroon). *Anim Husb Dairy Vet Sci*, v.3, p.5, 2019.

LONERGAN, P. et al. Maturation of oocytes in vitro. *Annu Rev Anim Biosci*, v. 4, p. 255-268, 2016.

GÓMEZ, E. et al. Efficient one-step direct transfer to recipients of thawed bovine embryos cultured in vitro and frozen in chemically defined medium. *Theriogenology*, v. 146, p. 39-47, 2020.

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

GONÇALVES, A. et al. Percoll® e optiprep® como mini gradientes para seleção espermática no sistema de produção in vitro de embriões bovinos. In: *Encontro De Iniciação Científica E Pós-Graduação Da Embrapa Clima Temperado*, v. 4, 2012.

GORDON, E. Produção laboratorial de embriões de gado. *CABI Publishing*, Reino Unido, p. 176-219. 2003.

HANSEN, P. The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle-why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? *Journal of animal science*, v. 98, p. 11, 2020.

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

LONERGAN, P. et al. Maturation of Oocytes in Vitro. *Annual Review of Animal Biosciences*, v. 4, p. 255-268, 2016.

LOSS, F. et al. Heterologous cell contacts and metabolics coupling in bovine cumulus oocyte complexes. *Molecular Reproduction and Development*, v. 28, p. 255-259, 1991.

MILLER, G. et al. Addition of penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) or bovine oviductal epithelial cells (BOEC) alone or in combination to bovine in vitro fertilization medium increases the subsequent embryo cleavage rate. *Theriogenology*, v. 41, n. 3, p. 689-696, 1994.

MOORE, S. et al. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 10314-10331, 2017.

Oliveira, C. et al. Biotécnicas da reprodução em bovinos: minicursos ministrados durante o 3º Simpósio "Biotécnicas da Reprodução em Bovinos". *Embrapa Gado de Leite*. v. 175, p. 52, 2014.

PICTON, H. et al. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol*, v. 145, p. 27-37, 1998.

PINCUS, G. et al. The Comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.*, v. 62, p. 665-675, 1935.

RAMIRES, L. Qué son los métodos de selección espermática? **Blog *in vitro*** – Buenos Aires. Acessado em 08/2023. Disponível em: <https://invitro.com.ar/que-son-los-metodos-de-seleccion-espermatica/>

RICHARDS, J. et al. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annu Rev Physiol.* v. 64, p. 69–92, 2002.

RIZOS, D. et al. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 44-50, 2008.

SAMARDŽIJA, M. et al. Vergleich zweier Aufbereitungsmethoden des Bullenspermas zur In-vitro-Fertilisation. *Tierärztliche Umschau*, v. 60, p. 192-199, 2005.

SANCHES, B. et al. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology*, v. 85, p. 1147-1151, 2016.

SANCHES, B. et al. Cryopreservation of in vitro-produced embryos: challenges for commercial implementation. *Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)*; Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil, August 17th to 19th, 2017.

SASSEVILLE, M. et al. Regulation of gap junctions in porcine cumulus-oocyte complexes: contributions of granulosa cell contact, gonadotropins, and lipid rafts. *Molecular Endocrinology*, v. 23, n.5, p. 700-710, 2009.

SAVANNAH L. et al. An updated protocol for in vitro bovine embryo production. *STAR Protocols*, v. 4, n. 1, p. 101924, 2023.

SENEDA, M. et al. Follicular wave synchronization prior to Ovum pick-up. *Theriogenology*, v. 150, n. 1, p.180-185, 2020.

SILVA, A. et al. Efeito do acasalamento entre a doadora e o touro (Holandês versus Gir) na produção *in vitro* de embriões bovinos. *Boletim de Indústria Animal*, v. 72, p. 51-58, 2015.

SMETANINA, I. et al. The effect of the composition of the culture media on bovine oocyte maturation and embryo development in vitro. *Ontogenez*, v. 31, p. 139-143, 2000.

STRINGFELLOW, D. et al. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. IETS, p. 112-113, Illinois, 1998.

TORRES-JÚNIOR J. et al. Efeito da presença do corpo lúteo no momento da aspiração folicular sobre a recuperação e competência *in vitro* de oócitos (*Bos indicus*). XX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, p.472-472, 2008.

VAJTA, G. et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*, v. 51, p. 53-58, 1998

VIANA, J. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. *O Embrião*, v. 51, p. 6-10, 2012.

VIANA J. et al. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. *Anim Reprod*, v. 14, p. 476-481, 2017.

VIANA, J. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technol. Newsl.* v. 40, n. 4, p. 18, 2022.

WATSON, A. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of Animal Science*, v. 85, n. 13, p. 1-3, 2007.