

ISSN 1516-7453

Outubro/2014

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**  
**Embrapa Gado de Leite**  
**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

## **Documentos 175**

### **Biotécnicas da Reprodução em Bovinos**

Minicursos ministrados durante o 3º Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em Bovinos” no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica

**Clara Slade Oliveira**  
**Raquel Varella Sarapião**  
**Carolina Capobiango Romano Quintão**

*Embrapa Gado de Leite*  
*Juiz de Fora, MG*  
*2014*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Gado de Leite**

Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Dom Bosco

36038-330 Juiz de Fora – MG

Fone: (32)3311-7400

Fax: (32)3311-7424

www.embrapa.br

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**Comite de Publicação da Embrapa Gado de Leite**

Presidente

*Marcelo Henrique Otenio*

Secretário

*Inês Maria Rodrigues*

Membros

*Alexander Machado Auad, Denis Teixeira da Rocha, Fernando César Ferraz Lopes, Francisco José da Silva Ledo, Frank Angelo Tomita Bruneli, Jackson Silva e Oliveira, Leônidas Paixão Passos, Letícia Caldas Mendonça, Nivea Maria Vicentini, Pêrsio Sandir D'Oliveira e Rosângela Zoccal*

Supervisão editorial *Clara Slade Oliveira*

Editoração eletrônica *Carlos Alberto Medeiros de Moura*

Normalização bibliográfica *Inês Maria Rodrigues*

Arte da capa *Adriana Barros Guimarães*

Fotos *Clara Slade Oliveira*

**1ª edição**

2ª impressão (2014): 1.000 exemplares

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)**

Embrapa Gado de Leite

---

Oliveira, Clara Slade.

Biotécnicas da reprodução em bovinos: minicursos ministrados durante o 3º Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em Bovinos” no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica / Clara Slade Oliveira, Raquel Varela Serapião e Carolina Capobiango Romano Quintão. – Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2014. 52 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 175).

ISSN 1516-7453

1. Superovulação. 2. Estimulação ovariana hormonal. 3. Embriões bovinos – colheita, seleção, classificação. 4. Protocolo de superovulação. 5. Aspiração de folículos ovarianos guiada por ultrassonografia. 6. Produção *in vitro* de embriões - PIVE. 7. Maturação de oócitos. 8. Fertilização *in vitro*. 9. Cultivo *in vitro*. 10. Criopreservação. 11. Vitrificação. I. Serapião, Raquel Varela. II. Quintão, Carolina Capobiango Romano. III. Título. IV. Série.

---

CDD 636-08926

© Embrapa 2014

# **Autores**

## **Clara Slade Oliveira**

Médica Veterinária, Doutora em Ciências Veterinárias, Analista da Embrapa Gado de Leite, Valença - RJ

## **Raquel Varela Serapião**

Médica Veterinária, Doutora em Biotecnologia e Melhoramento Animal, Pesquisadora da PESAGRO-RIO, Valença - RJ

## **Carolina Capobiango Romano Quintão**

Farmacêutica e Bioquímica, Mestre em Genética e Biotecnologia, Analista da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora - MG



# Apresentação

As biotécnicas da reprodução animal são ferramentas singulares para o avanço tecnológico da pecuária nacional, pois possibilitam a expansão e seleção do material genético adequado para o melhoramento animal. Graças a um esforço contínuo, o Brasil se tornou um grande utilizador e multiplicador destas tecnologias, o que coloca o país na condição de maior produtor de embriões bovinos por fertilização *in vitro* do mundo.

A difusão e o aprimoramento destas biotécnicas são desafios importantes para os profissionais da área, para que elas possam alcançar frações cada vez mais representativas da pecuária nacional, e se tornem ferramentas disponíveis para todos os produtores.

O presente documento Biotécnicas da Reprodução em Bovinos, em sua primeira edição, busca reforçar o compromisso da difusão destas tecnologias. Nas páginas a seguir, os principais aspectos teóricos e práticos das biotécnicas mais utilizadas no Brasil são abordados, buscando introduzir ao leitor a essência de cada uma delas. A demonstração prática das atividades, realizada nos minicursos do III Simpósio TecLeite de Biotécnicas da Reprodução em Bovinos, realizada no Campo Experimental Santa Mônica em setembro do corrente ano, somada ao conteúdo do presente documento, enriquece a leitura e traz ao participante visão complementar destas importantes ferramentas.

***Paulo do Carmo Martins***

Chefe-geral

Embrapa Gado de Leite



# Sumário

Superovulação e Colheita de Embriões .....	9
Dinâmica folicular .....	10
Superovulação .....	10
Seleção das doadoras .....	11
Seleção das receptoras .....	11
Protocolo de Superovulação .....	11
Seleção e classificação dos embriões recuperados .....	14
Desenvolvimento embrionário em bovinos .....	16
Material utilizado para realização da superovulação de embriões... ..	18
Literatura Complementar .....	18
Referências .....	19
Aspiração Folicular Guiada por Ultrassonografia .....	21
Acessórios necessários para o procedimento .....	22
Escolha das doadoras .....	23
Sincronização de onda folicular .....	24
Procedimento .....	25
Literatura Complementar .....	27
Referências .....	27
Produção <i>In Vitro</i> de Embriões (PIVE) Bovinos .....	31
Obtenção de oócitos .....	31
Maturação <i>in vitro</i> (MIV) .....	32
Fecundação <i>in vitro</i> (FIV) .....	36
Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) .....	40
Classificação dos embriões .....	42
Criopreservação de embriões .....	44
Importância .....	44
Técnica .....	44
Procedimento de vitrificação .....	46
Reaquecimento dos blastocistos .....	46
Literatura Complementar .....	47
Referências .....	47



# Superovulação e Colheita de Embriões (SOV-TE)

A técnica de superovulação e colheita de embriões consiste em recolher embriões de uma fêmea doadora, que serão transferidos para uma fêmea receptora com a finalidade de completarem o período de gestação. Representa uma biotecnologia mundialmente difundida, e um importante instrumento para o melhoramento genético de rebanhos, acelerando e conferindo maior precisão no processo de seleção animal (BARUSELLI et al., 2006).

A fêmea bovina é mono-ovulatória, portanto apenas um oócito deve ser liberado de um folículo durante seu ciclo estral. O princípio da técnica de superovulação envolve o conceito de induzir a ovulação de vários folículos, e a liberação de vários oócitos, e permitir a fertilização e o desenvolvimento destas estruturas até o estágio de blastocisto. Assim, são coletados vários embriões de uma fêmea superovulada, o que permite a disseminação de sua genética de forma mais abrangente do que no caso da inseminação artificial, onde apenas um embrião é formado. Este resultado é alcançado através da aplicação de hormônios, que impedem o fenômeno de dominância folicular, observado nas vacas (BÓ et al., 2006).

## Dinâmica folicular

Durante a onda de crescimento folicular, três fases estão presentes. O **recrutamento** corresponde ao início do crescimento de vários folículos, desencadeado pelo hormônio folículo estimulante (FSH). A segunda fase corresponde à **seleção e dominância**: um folículo cresce mais do que os outros, e se torna dominante. A presença de um folículo maior inibe o crescimento dos demais folículos. O crescimento folicular nesta fase depende do FSH e de pulsos basais de LH. O folículo dominante produz alta concentração de estrógeno (17 $\beta$  estradiol). A terceira fase é a **ovulação**, que é desencadeada pelo pico de LH liberado pela hipófise. A ovulação somente ocorre se, no momento em que o folículo dominante produz alta concentração de estrógeno, não existam níveis elevados de progesterona. Ou seja, caso um corpo lúteo funcional esteja presente, não haverá liberação de pico de LH nem a ovulação. Os folículos da onda que não ovularem (incluindo os folículos dominantes), entrarão em atresia – processo de degeneração das estruturas. Portanto, normalmente apenas um folículo ovula por ciclo estral, liberando um ócito. O ciclo estral da vaca compreende 2 a 3 ondas de crescimento folicular, porém somente uma é terminada na ausência de níveis elevados de progesterona (GINTHER et al., 1989; AERTS e BOLS, 2010).

## Superovulação

Os protocolos de superovulação visam promover o crescimento e ovulação de todos os folículos recrutados. Para tanto, a onda folicular é sincronizada, e altas doses de FSH são administradas aos animais antes que se estabeleça a dominância. Assim, os efeitos inibitórios do folículo dominante sobre o crescimento dos demais folículos são bloqueados, e os efeitos deletérios da atresia sobre a qualidade dos ócitos ovulados são evitados. Portanto, o hormônio folículo estimulante em altas concentrações promove o crescimento simultâneo de vários folículos com características fisiológicas semelhantes daqueles selecionados para ovularem. A divergência folicular é impedida, e os folículos terciários que seriam fadados a atresia se tornam folículos ovulatórios (CARVALHO et al., 2008).

## **Seleção das doadoras**

As fêmeas selecionadas para participar de programas de superovulação devem ser geneticamente superiores, e apresentar adequado estado nutricional. Ao contrário do que ocorre na produção *in vitro* de embriões, na qual todo o processo de embriogênese ocorre no laboratório, no procedimento de SOV o sistema reprodutivo da doadora é utilizado para produzir os embriões. Portanto, a mesma deve apresentar ciclos estrais regulares. Ao exame reprodutivo, é importante descartar animais apresentando defeitos anatômicos, tais como desvio de cervix, distúrbios reprodutivos, incluindo patologias de etiologia genética – que podem ser transmitidas aos descendentes – e adquiridas, como aderências uterinas, de tuba, ovário, mucometra, entre outras. Estas condições impedem a coleta, o desenvolvimento e transporte adequado dos gametas e embriões, inviabilizando o procedimento (BARUSELLI et al., 2006).

## **Seleção das receptoras**

A seleção das receptoras é um ponto crítico. A aquisição das fêmeas é custosa e delicada, e o ideal é a utilização de animais do próprio rebanho para evitar problemas infecciosos (SCANAVEZ et al., 2013). Aqui no Campo Experimental Santa Mônica (CESM), as receptoras utilizadas são novilhas pesando mais de 350 kg, com porte adequado à raça da doadora do embrião a ser transferido, e com condições reprodutivas adequadas. O animal deve ter apresentado pelo menos dois ciclos regulares, não demonstrar distúrbios de pelve e nutricionais, e ter condições uterinas adequadas, sem assimetria e sinais de endometrite. A escolha das receptoras é crucial para o sucesso do programa de TE, pois qualquer distúrbio pode causar reabsorção embrionária, abortamento, e até mesmo distocias no momento do parto.

## **Protocolo de Superovulação**

O Protocolo apresentado foi adaptado para animais mestiços Gir-Holandes, e é utilizado com sucesso nas condições do CESM.

**Diluição do FSH** – O protocolo hormonal utilizado foi delineado para animais mestiços. A quantidade de FSH administrada pode variar de

acordo com características raciais e também individuais. A dose ideal deve ser ajustada de acordo com a resposta de cada doadora.

1. Diluir o conteúdo liofilizado de FSH (1.000 UI) em 21 mL de solução fisiológica. Em seguida, dividir o conteúdo em 03 frascos contendo 7 mL cada.
2. Acrescentar 13 ml de solução fisiológica em cada frasco, de modo a completar para um volume final de 20 mL.
3. Preparar duas seringas dos seguintes volumes: 4 mL, 3 mL, 2 mL e 1 mL – duas de cada, correspondendo ao volume final de 20 mL.
4. Identificar as seringas com os dias para aplicação de cada uma (opcional) – exemplo: 6<sup>a</sup> manhã, 6<sup>a</sup> tarde, sábado manhã, sábado tarde, domingo manhã, domingo tarde, 2<sup>a</sup> manhã, 2<sup>a</sup> tarde -, e completar cada seringa para 5 mL com solução fisiológica. (Este procedimento evita possíveis perdas na aplicação de volumes pequenos, mas as seringas poderão ser confundidas caso não haja identificação adequada).

**Sincronização da onda folicular (d0)** - Este procedimento visa “zerar” as ondas foliculares existentes e iniciar uma nova onda. Na presença de progesterona, o benzoato de estradiol induz a atresia de todos os folículos ovarianos, e uma nova onda folicular emergirá em 4 dias.

Para este fim, inserir o dispositivo de progesterona (implante auricular ou vaginal) e aplicar 2 mg de benzoato de estradiol.

**Aplicação de FSH para driblar o fenômeno de seleção e dominância (d5 a d8)** – Suplementar o FSH a partir do quinto dia do protocolo, em doses decrescentes conforme especificado abaixo:

- dia 5: 66 UI (seringa de 4 mL) pela manhã e à tarde;
- dia 6: 50 UI foram aplicadas (seringa de 3 mL) pela manhã e pela tarde;
- dia 7: 33 UI foram aplicadas (seringa de 2 mL) pela manhã e pela tarde;
- dia 8: 16 UI foram aplicadas (seringa de 1 mL) pela manhã e pela tarde.

**Lise do corpo lúteo, fonte endógena de progesterona (d7)** – Na tarde do sétimo dia do protocolo, aplicar nas doadoras via intramuscular 225 mg (3 mL) de d-clorprostenol, análogo da  $\text{PGF}_2\alpha$ , para promover a lise do CL.

**Indução de ovulação dos folículos crescidos (d9) e inseminação (d9 e 10)** – Ao final do tratamento com FSH, os folículos já estarão crescidos e deverá ser aplicado um indutor de ovulação, por exemplo, um medicamento análogo ao GnRH (buserelina), na quantidade de 0,02 mg (5 mL) no nono dia. A inseminação artificial deve ser realizada 12 h após (dia 9 do protocolo à tarde), e se possível repetida no décimo dia do protocolo pela manhã.

**Procedimento de colheita dos embriões** – A colheita dos embriões é realizada no sétimo dia após a segunda inseminação artificial. Neste período, os embriões estão fluando no lúmen da ponta dos cornos uterinos, e se apresentam normalmente em fase de mórula ou blastocisto.

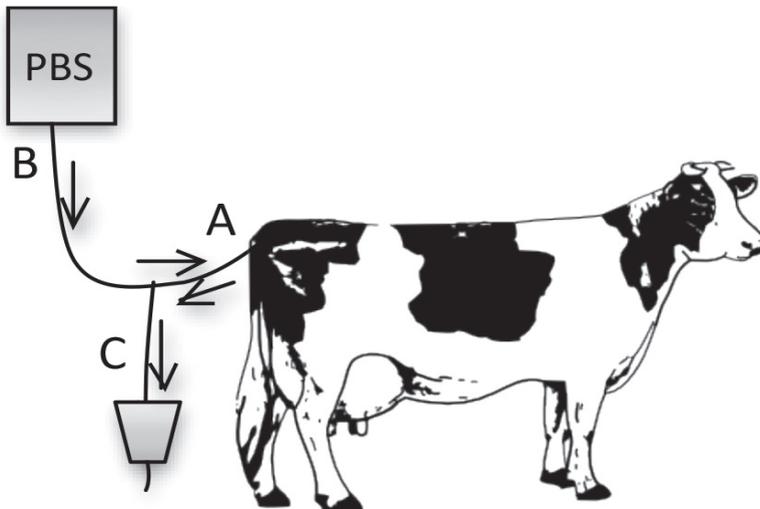
Com o animal contido no tronco, é realizada higienização da região perineal do mesmo. Em seguida, a doadora é anestesiada por injeção epidural baixa de 0,06 g de cloridrato de lidocaína (3 mL).

O expansor de cérvix pode auxiliar o procedimento em animais de cervix estreita, como normalmente é o caso de novilhas. Este instrumento é passado no interior da cérvix.

A sonda de Foley estéril deve ser inserida via intracervical com o auxílio de um mandril, e posicionada no corpo uterino. O balão deve ser inflado com ar, até fixar a sonda no local desejado. O mandril é retirado, e uma sonda em Y é acoplada à sonda de Foley, compondo o sistema fechado de colheita de embriões (Figura 1). Em suas outras extremidades, são fixados o frasco de DPBS, e o copo coletor de embriões.

O sistema contém uma trava em cada extremidade, para controle da entrada e saída do líquido instilado, formando uma pressão negativa que facilita a retirada do conteúdo, por sifonagem.

A solução utilizada, "*Dulbecco Phosphate Buffered Saline*" (DPBS) é uma solução salina tamponada, com osmolaridade e pH fisiológico, de forma a manter as características do embrião. Também contém antibiótico, reduzindo as possíveis contaminações.



**Figura 1.** Esquema adotado para colheita de embriões em sistema fechado. O equipamento em Y liga-se à sonda de Foley na extremidade A, ao frasco de PBS, na extremidade B, e ao filtro coletor, na extremidade C. Através de válvulas, o veterinário controla a direção do fluxo; primeiramente de B para A, posteriormente de A para C.

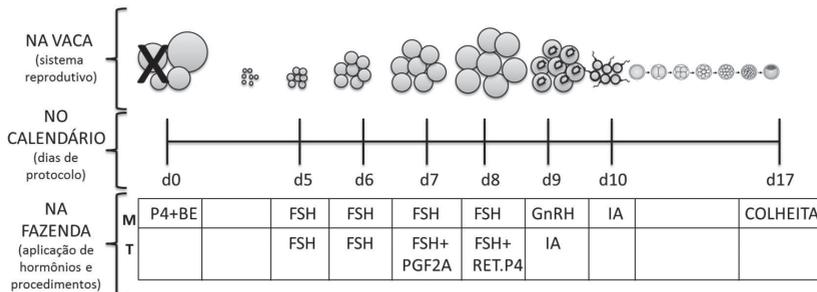
O copo coletor apresenta um filtro que permite a retenção apenas dos embriões, desprezando o restante do conteúdo recuperado. Instila-se o conteúdo até encher os cornos, fecha-se a trava da saída do DPBS, e a saída para o copo coletor é aberta, recolhendo o líquido instilado. A operação é repetida várias vezes, até lavar o útero com cerca de 1 L, quando o balão é desinflado e é retirada a sonda do animal. A sonda pode ser fixada no corpo do útero, lavando o útero de uma só vez, ou na base de cada corno uterino, e a lavagem é realizada em um corno por vez.

### **Seleção e classificação dos embriões recuperados**

1. Deixar todo o líquido retido no sistema escorrer ao copo coletor.
2. Retira-se o copo, e com auxílio de seringa agulhada, o filtro é lavado com DPBS, e transfere-se o conteúdo para uma placa de Petri

- (placa de rastreamento). Com uma caneta de retroprojektor, marcar a placa para facilitar a procura.
- Em outra placa de Petri, distribuir dez gotas de solução de manutenção de embriões. No microscópio estereoscópico, selecionar as estruturas recuperadas presentes na placa de rastreamento, e com auxílio de uma micropipeta transferir os embriões para a primeira gota de meio. Os embriões devem ser lavados em todas as gotas do meio para diminuir a possibilidade de contaminação, de acordo com as recomendações da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (*"International Embryo Transfer Society"* - IETS). Os embriões são classificados por sua morfologia em mórula, blastocisto inicial e blastocisto, que são normalmente as estruturas encontradas quando a coleta é feita no 7º dia após a IA, além de estruturas degeneradas.
  - Os embriões produzidos no CESH pela técnica de superovulação são destinados à criopreservação, e serão transferidos futuramente para receptoras, no 7º dia após cio. O resumo esquemático do protocolo apresentado encontra-se na Figura 2.

O QUE ACONTECE...



**Figura 2.** Resumo esquemático do protocolo de SOV. No d0, a aplicação de P4 + BE “zeram” a onda folicular da doadora, promovendo atresia dos folículos em crescimento. Uma nova onda se inicia no d4. Do d5 ao d8, o FSH é aplicado nos animais, promovendo crescimento de todos os folículos recrutados, sem que haja seleção e dominância. A aplicação de PGF2A no d7 promove lise de corpo lúteo que possa existir, e o implante de P4 é retirado no d8. No d9, os folículos crescidos ovulam pela ação do GnRH aplicado, liberando os oócitos, que são captados pela tuba uterina. No d9 à tarde e no d10 pela manhã, as doadoras são inseminadas. Os oócitos fecundados seguem o desenvolvimento embrionário e no d17 se encontram no útero, onde serão coletados.

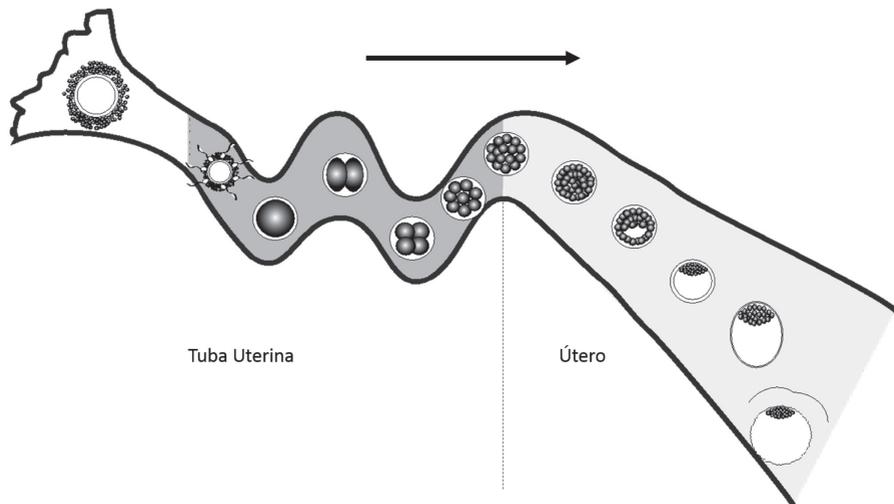
**Siglas:** SOV: superovulação. M: manhã. T: tarde. P4: implante de progesterona. BE: benzoato de estradiol. FSH: hormônio foliculo estimulante. PGF2A: análogo de prostaglandina F2A. GnRH: análogo do hormônio liberador de gonadotrofinas. IA: inseminação artificial.

## Desenvolvimento embrionário em bovinos

Embrião é um organismo nos primeiros estádios de desenvolvimento, que não apresenta ainda características anatômicas que permitam a identificação de sua espécie – um embrião de bovino é semelhante a um embrião de camundongo, por exemplo.

Feto é um organismo que já se apresenta potencialmente formado, caracterizado anatomicamente por sua espécie, mas ainda depende das condições uterinas para sobrevivência.

A embriogênese em mamíferos se inicia com a fecundação do oócito e formação do zigoto (Figura 3). A **singamia** é o processo de fusão entre o pronúcleo feminino e masculino, após a fertilização do oócito pelo espermatozóide (WATSON & BARCROFT, 2001).



**Figura 3.** Desenvolvimento embrionário pré-implantação em bovinos.

**Clivagens** – Por um período variável entre espécies, o zigoto sofre sucessivas clivagens – ciclos de divisões mitóticas. As células dos embriões são denominadas blastômeros. As células do zigoto e dos embriões de 2, 4 e 8 células são totipotentes – podem dar origem a indivíduos completos e aos componentes fetais da placenta (SENGER, 2003).

**Morulação** – A formação da mórula ocorre no estágio de 16 a 32 células, e corresponde ao aparecimento de junções tipo GAP nas células internas, que permitem a comunicação entre elas além de fazer com que as mesmas permaneçam fortemente unidas. As células externas desenvolvem as junções “*tight*” entre as células, fazendo com que as mesmas apresentem forte comunicação. Se torna difícil a distinção dos blastômeros nestas estruturas, e sua contagem, por sua compactação. Assim, o sódio é bombeado para espaços intercelulares e por osmose a água se acumula nestes locais, formando a blastocele (STANTON et al, 2003).

**Blastulação** - Neste estágio, é formado o primeiro grupo de células que contribuirá para a formação de um novo indivíduo, denominado massa celular interna - a porção embrionária dos blastocistos. Esta diferenciação ocorre quando o acúmulo de líquido e a blastocele (cavidade embrionária) são estabelecidos. Este grupo de células permanece protegido da exposição ao líquido, e se mantém pluripotente. As células externas do embrião se diferenciam em células trofoblásticas – um grupo de células que dará origem à porção embrionária da placenta. Após a expansão dos blastocistos, ocorre a segregação da massa celular interna em células que constituirão o endoderma primitivo (que mais tarde dará origem ao saco vitelino), e em células pluripotentes, do epiblasto (que darão origem ao indivíduo). A partir do estágio de blastocisto, células trofoblásticas não contribuem mais para a formação das linhagens derivadas da massa celular interna (SENGER, 2003).

**Eclosão** – Após o desenvolvimento do blastocisto, é preciso que haja a eclosão do mesmo para que seja possível sua implantação. Primeiramente, o blastocisto precisa aumentar o número de células e acumular líquido suficiente na blastocele, para que exerça pressão adequada sobre a zona pelúcida. As células trofoblásticas então iniciam a produção de enzimas proteolíticas que promoverão o enfraquecimento da zona pelúcida, que é facilmente rompida quando ocorre o aumento da pressão. Nos últimos estágios do processo, o blastocisto intercala pulsos de contração e relaxamento, e estes pulsos de pressão gerados causam a ruptura final da zona pelúcida. Assim, o embrião adquire contato

direto entre as células trofoblásticas do embrião e as células uterinas da fêmea gestante, dando início ao processo de implantação embrionária (WATSON et al., 2004).

Para Classificação de Embriões e Vitriificação de Embriões, acessar o capítulo de Produção *in vitro* de Embriões.

### **Material utilizado para a realização da superovulação e colheita de embriões**

- Estereomicroscópio (70 X)
- Sondas uterinas de Foley (tamanhos 18, 20, 22)
- Mandril para fixação da sonda
- Sistema coletor (equipo) em Y
- Filtros com copo coletor para coleta de embriões
- Seringas descartáveis de 20 ml
- Seringas descartáveis de 50 mL
- Agulha 19G
- Placas de Petri 100 x 20 mm
- Placas de Petri 40 x 10 mm
- Micropipetador 5-20 uL
- Palheta de 0,25 mL
- DMPBS
- Solução Holding
- Ponteiras descartáveis

### **Literatura Complementar**

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

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals**. 7. ed. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 528 p.

PALMA, G. A. **Biotecnología de la Reproducción**. Local: Argentina.

Ediciones Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria (INTA), 2001. p. 149-197.

SENGER, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2. ed. Local: Moscow, Indiana. Current Conceptions, Inc., 2003. p. 284-296.

## Referências

AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: antral development, exogenous influence and future prospects. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 45, p. 180-187, 2010.

BARUSELLI, P. S.; DE SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; BÓ, G. A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 77-88, 2006.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; CHESTA, P. M.; MARTINS, C. M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 89-101, 2006.

CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* × *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 167-175, 2008.

GINTHER, O. J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **J. Reprod. Fert.**, v. 8, p. 223-230, 1989.

SENGER, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2. ed. Local: Moscow, Indiana. Current Conceptions, Inc., 2003. p. 284-296.

STANTON, J. A.; MACGREGOR, A. B.; GREEN, D. P. Gene expression

in the mouse preimplantation embryo. **Reproduction**, v. 125, p. 457-468, 2003.

SCANAVEZ, A. L.; CAMPOS, C. C.; SANTOS, R. M. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 65, n. 3, p. 722-728, 2013.

WATSON, A. J.; BARCROFT, L. C. Regulation of blastocyst formation. **Front Bioscience**, v. 6, p. 708-730, 2001.

WATSON, A. J.; NATALE, D. R.; BARCROFT, L. C. Molecular regulation of blastocyst formation **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 583-592, 2004.

# Aspiração Folicular Guiada por Ultrassonografia

A utilização das técnicas da reprodução assistida é considerada a base da produção pecuária mundial, tornando-se cada vez mais importante para enfrentar parte dos desafios que surgirão nas próximas décadas. Devido a isso, a utilização da técnica de aspiração folicular associada à produção *in vitro* de embriões (OPU-PIV), possibilitará aumentar o número de nascimentos por fêmea de alto valor genético, melhorando o ganho genético anual de 2% proporcionado pela inseminação artificial para aproximadamente 2,5% (VISHWANATH, 2003).

A aspiração folicular transvaginal orientada por ultra-sonografia ou OPU (*Ovum Pick Up*) é a técnica de eleição para a obtenção de oócitos de doadoras vivas, em bovinos, destinados à produção *in vitro* de embriões (PIV). Esta biotecnologia encontra-se difundida por vários países, mas o Brasil alcançou uma posição de destaque frente ao número surpreendente de embriões produzidos por esta técnica no país (STROUD e CALLESEN, 2012).

Entre os fatores que podem influenciar os programas OPU-PIV é possível considerar fatores mecânicos tais como: aparelho de ultrassom (GALLI et al., 2001), domínio da técnica de aspiração pelo operador (SCOTT et al., 1994), pressão da bomba de vácuo (HASHIMOTO et al., 1999), tipo de agulha utilizada (BOLS et al., 2004) e frequência

de aspiração (MERTON et al., 2003). E entre os fatores biológicos é possível destacar: raça (DE ARMAS et al., 1994), idade (MERTON et al., 2003), estado reprodutivo (BUNGARTZ et al., 1995), fase do ciclo estral (MACHATKOVÁ et al., 1996), status nutricional (OLIVEIRA et al., 2002), estresse térmico (TORRES-JÚNIOR et al., 2008), além da variabilidade de resposta dos animais e dos sistemas de cultivo *in vitro* empregados (LONERGAN e FAIR, 2008). A influência destes fatores pode diminuir a competência dos oócitos para o desenvolvimento *in vitro*, afetando a produção e qualidade dos embriões, causando perdas de material genético e perdas econômicas nos programas OPU-PIV (BLONDIN e SIRARD, 1995).

### **Acessórios necessários para o procedimento**

São importantes porque afetam consideravelmente a quantidade e qualidade dos complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) recuperados, e consequentemente a viabilidade destes para a produção *in vitro* dos embriões.

**Agulhas para aspiração folicular** – Inicialmente, a aspiração era realizada com agulhas longas, produzidas especialmente para aspiração folicular. Estas agulhas apresentavam alto custo e rapidamente perdiam o corte mas, apesar disso, eram usadas para vários animais visando minimizar o custo do procedimento, a despeito das extensas lesões que causavam nos ovários das doadoras. Hoje, é comum a utilização de agulhas descartáveis, de 18 e 19 G, para o procedimento. Elas podem ser substituídas com maior frequência, diminuindo os danos aos ovários das doadoras (BOLS et al., 2004).

**Pressão negativa do sistema, gerada por bomba de vácuo** – A pressão do sistema afeta a recuperação e a qualidade dos CCOs. Altas pressões danificam os oócitos, provocando perda das células do *cumulus* e ruptura da zona pelúcida. Por outro lado, pressões muito baixas dificultam a recuperação e facilitam tanto a aderência das estruturas no circuito como a formação de coágulos. A pressão ideal deve ser ajustada a cada sistema e bombas de vácuo que permitam a estabilidade da pressão ajustada, sem permitir variações, são preferíveis. Normalmente, esta pressão ideal está entre 60 e 100 mm de mercúrio. Como existem dife-

rentes modelos de bombas de vácuo no mercado que podem apresentar diferentes calibrações na pressão do vácuo, a maneira mais adequada para ajustar a pressão negativa do aparelho é mensurar em volume de líquido aspirado por minuto. Neste caso recomenda-se pressão entre 10 e 20 mL de líquido aspirado por minuto (HASHIMOTO et al., 1999).

**Transdutor** – Diversos transdutores estão disponíveis no mercado, com diferentes especificações e finalidades. O profissional deve considerar se o equipamento será de uso exclusivo ou não para punção, e procurar a resolução que consiga trabalhar de forma adequada. Normalmente, são utilizados para punção transdutores de 7.5 MHz, porém outras alternativas estão disponíveis (GALLI et al., 2001).

**Rolha, tubos Falcon, circuito** – Deve-se levar em consideração a possibilidade de reutilização do material após esterilização, uma vez que nem todos os materiais são adequados para este fim. Muitas opções estão disponíveis no mercado, cabendo ao profissional selecionar com critério materiais com custo e benefício interessantes.

## **Escolha das doadoras**

Alguns animais apresentam, naturalmente, uma tendência para recrutamento de um maior número de folículos e, por isso, tornam-se mais atrativos para serem escolhidos como doadoras de oócitos. Para a maioria dos objetivos, as doadoras devem apresentar composição genética privilegiada. Patologias adquiridas, como aderências de tuba, útero, entre outras não impossibilitam a punção folicular. Da mesma forma, animais gestantes, ou com patologias uterinas como mucometra, também podem ser aspirados – desde que seja possível manusear os ovários, e que eles estejam em boa condição de ciclicidade (SENEDA et al., 2001).

O uso de animais com cistos ovarianos e outras patologias que ocasionem desbalanço hormonal como doadoras não é aconselhável, pois reflexos negativos sobre a qualidade dos gametas são observados.

Animais pré-púberes fornecem oócitos com reduzida competência ao desenvolvimento. Há relatos de que animais senis também tendem a

apresentar oócitos de qualidade inferior, assim como animais subnutridos em condições de estresse.

Fêmeas de raças europeias tendem a apresentar números inferiores de oócitos recuperados em relação a fêmeas zebuínas. Isso ocorre porque existe um maior número de folículos recrutados na onda folicular de animais zebuínos.

Grande parte do sucesso e difusão da técnica de produção *in vitro* de embriões no Brasil se deve a esta característica, observada em animais Nelore, por exemplo (PONTES et al., 2011).

### **Sincronização de onda folicular**

Devido aos fenômenos de seleção e dominância que ocorrem durante as ondas de crescimento folicular das fêmeas bovinas, o momento do ciclo estral em que se faz a aspiração folicular pode interferir na quantidade e na qualidade dos CCOs recuperados. A presença de um folículo dominante inibe o crescimento dos demais folículos, e os gametas iniciam degeneração. Por isso, para aumentar a competência ao desenvolvimento dos CCOs recuperados, recomenda-se a sincronização da onda de crescimento folicular das doadoras de oócitos. Assim, os oócitos são recuperados no início da onda folicular, evitando os efeitos prejudiciais do folículo dominante (PFEIFER et al., 2009).

Além disso, o tamanho uniforme dos folículos possibilita melhores taxas de recuperação. O diâmetro dos folículos recomendado para recuperação é de 2 a 8 mm. Folículos muito grandes correspondem a taxas de recuperação inferiores às obtidas em folículos menores (VASSENA et al., 2003).

A sincronização da emergência de uma nova onda folicular pode ser realizada de diferentes maneiras. O FSH e o eCG estimulam o crescimento de folículos adicionais, sendo indicados para doadoras de oócitos. O benzoato de estradiol na presença de altas concentrações de progesterona promove o início de uma nova onda, quatro dias após a

aplicação. Por isso, muitos técnicos utilizam este protocolo 5 a 7 dias antes da aspiração folicular. A aplicação de análogos da prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  promove a lise do corpo lúteo, que por ser muito vascularizado dificulta o procedimento de aspiração.

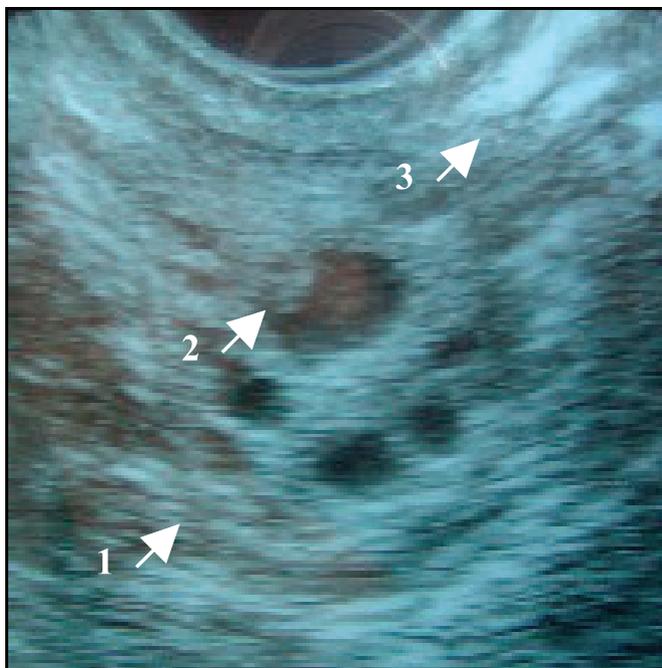
Outra forma interessante de provocar a emergência de uma nova onda folicular é a aspiração do folículo dominante 72 horas antes da OPU.

## Procedimento

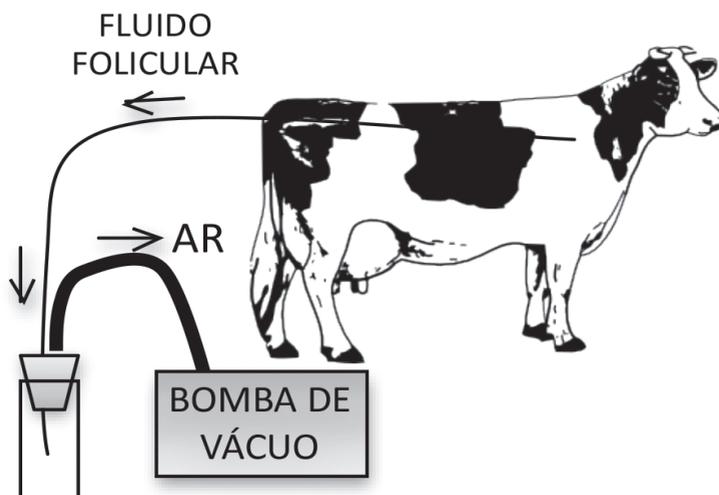
A fêmea doadora de oócitos é devidamente contida no tronco, e sua higienização é realizada, lavando com água e sabão a região perineal e a cauda. Com agulha descartável 19 G, é realizada anestesia epidural no espaço sacrococcígeo, com 40 mg a 80 mg (2 a 4 mL) de cloridrato de lidocaína, que varia com o tamanho e temperamento do animal.

Com a mão esquerda enluvada no reto do animal, introduzimos o transdutor setorial adaptado para a punção na vagina e, em seguida, a guia apresentando uma agulha descartável em sua extremidade, é acoplada ao transdutor. Localizamos os ovários e os tracionamos, um de cada vez, para a superfície de contato do transdutor, que toca a parede do saco vaginal. A imagem gerada no monitor corresponde ao ovário e suas estruturas, sendo os folículos apresentados de forma anecóica (preto), pela presença de líquido, e o parênquima de forma ecogênica (cinza claro) (Figura 4).

Durante a sessão de aspiração, os folículos são contados para que seja calculada a taxa de recuperação. Com auxílio de linha demarcada no monitor, o ovário é posicionado e a agulha introduzida no interior de cada folículo a ser aspirado. A partir da guia de punção, segue um circuito fechado, que desemboca em tubo Falcon com DPBS, heparina (10 UI/mL) e soro fetal bovino. No tubo Falcon é ligada uma mangueira de silicone, que acaba em bomba de vácuo (Figura 5). Esta bomba, quando acionada, promove a sucção do líquido folicular para o tubo Falcon, e é regulada para aproximadamente 90 mm Hg.



**Figura 4.** Imagem ultra-sonográfica de punção folicular (1:limite do ovário; 2: folículos; 3:agulha de punção).



**Figura 5.** Esquema de sistema fechado com pressão negativa para recuperação de oócitos in vivo.

## Literatura Complementar

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

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals**. 7. ed. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 528 p.

PALMA, G.A. **Biotechnologia de la Reproducion**. Local: Argentina. Ediciones Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria (INTA), 2001. p. 149-197.

SENGER, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2. ed. Local: Moscow, Indiana. Current Conceptions, Inc., 2003. p. 284-296.

## Referências

BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 41, p. 54-62, 1995.

BOLS, P. E. J.; LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; VAN SOOM, A. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. **Theriogenology**, v. 62, p. 906-914, 2004.

BUNGARTZ, L.; LUCAS-HAHN, A.; RATH, A.; NIEMANN, H. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. **Theriogenology**, v. 43, p. 667-675, 1995.

DE ARMAS, R.; SOLANO, R.; PUPO, C. A.; AGUILAR, A.; AGUIRRE, A.; RIEGO, E.; CASTRO, F. O. Effect of the donor oocyte breed on in vitro fertilization results in cattle. **Theriogenology**, v. 41, p. 186, 1994.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI,

G. Embryo production by ovum pick-up from live donors. **Theriogenology**, v. 55, p. 1341-1357, 2001.

HASHIMOTO, S.; TAKAKURA, R.; KISHI, M.; SUDO, T.; MINAMI, N.; YAMADA, M. Ultrasound-guided follicle aspiration: the collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. **Theriogenology**, v. 51, p. 757-765, 1999.

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro*-produced bovine embryos—Dealing with the warts. **Theriogenology**, v. 69, p. 17-22, 2008.

MACHATKOVÁ, M.; JOKESOVÁ, E.; PETELÍKOVÁ, J.; DVORÁČEK, V. Developmental competence of bovine embryo derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 45, n. 3, p. 801-810, 1996.

MERTON, J. S.; DE ROOS, A. P. W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, p. 651-674, 2003.

OLIVEIRA, J. F.; NEVES, J. P.; MORAES, J. C.; GONCALVES, P. B.; BAHR, J. M.; HERNANDEZ, A. G.; COSTA, L. F. Follicular development and steroid concentrations in cows with different levels of fertility raised under nutritional stress. **Anim. Reprod. Sci**, v. 73, p. 1-10, 2002.

PFEIFER, L. F. M.; SARTORI, R.; PIVATO, I.; RUMPF, R.; NOGUEIRA, G. P.; XAVIER, E. G.; DIONELLO, N. J. L.; CORRÊA, M. N. Effect of circulating progesterone on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. **Anim. Reprod.**, v. 6, p. 473-480, 2009.

PONTES, J. H. F.; MELO STERZA, F. A.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANCHES, B. V.; RUBIN, K. C. P.; SENEDA, M. M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v.75, n. 1640-1646, 2011.

SCOTT, C. A.; ROBERTSON, L.; DE MOURA, R. T. D.; PATERSON, C.; BOYD, J. S. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration in cows. **Vet. Rec.**, v. 134, p. 440-443, 1994.

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

STROUD, B; CALLESEN, H. IETS statement on worldwide ET statistics for 2010. **Anim. Reprod.**, v. 9, p. 210-216, 2012.

TORRES-JÚNIOR, J. R de S.; PIRES, M. de F. A.; SÁ, W. F. de; FERREIRA, A. de M.; VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; RAMOS, A. A.; FOLHADELLA, I. M.; POLISSENI, J.; FREITAS, C. de; CLEMENTE, C. A. A.; SÁ FILHO, M.F. de; PAULA-LOPES, F. F.; BARUSELLI, P. S. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 155-166, 2008.

VASSENA, R.; MAPLETOFT, R. J.; ALLODI, S.; SINGH, J.; ADAMS, G. P. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. **Theriogenology**, v. 60, p. 923-932, 2003.

VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. **Theriogenology**, v. 59, p. 571-584, 2003.



# Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE) Bovinos

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

As principais aplicações desta biotécnica envolvem:

1. reprodução assistida de animais (fêmeas) de alto valor genético portadores de patologias reprodutivas adquiridas (FABER et al., 2003);
2. melhoramento genético animal (aumento da intensidade de seleção e redução do intervalo entre gerações) (VARAGO et al., 2008);
3. pesquisa dos processos envolvidos na fecundação de gametas e no desenvolvimento embrionário inicial (AHUMADA et al., 2013);
4. possibilidade de formação de um banco de germoplasma para conservação de espécies (HASLER, 2014).

## **Obtenção de oócitos**

Podem ser obtidos de doadoras vivas, através da aspiração folicular, ou, a partir da punção de ovários de fêmeas abatidas em abatedouros.

- **Aspiração folicular *in vivo***: Obtenção de oócitos a partir de animais vivos. No passado, era realizada por laparotomia, dificultando o procedimento pelas complicações pós-cirúrgicas (incluindo aderências ovarianas), tempo e custo relacionados (CALLESEN et al., 1987). Com o advento da técnica de punção folicular guiada por ultrassonografia na década de 80, o processo se tornou menos invasivo, possibilitando otimização da técnica com relação ao número de animais puncionados e à frequência de sessões realizadas no mesmo animal.
- **Aspiração folicular a partir de ovários coletados em abatedouro**: Imediatamente após o abate, os ovários são coletados e transportados ao laboratório, onde folículos entre 2 a 8 mm são aspirados com auxílio de agulha acoplada a seringa ou bomba de vácuo. Este método é utilizado, principalmente, para experimentos científicos e controle de qualidade dos sistemas de PIVE em laboratórios (AHUMADA et al., 2013).
- **"Slicing"**: Utilizado para maximização da recuperação de oócitos, normalmente a partir de ovários de fêmeas de alto valor genético que vem a óbito. Nesta técnica, a camada cortical do ovário é seccionada em pequenos fragmentos para liberação dos oócitos (HASLER, 1998).

### **Maturação *in vitro* (MIV)**

A maturação dos oócitos envolve uma série de transformações nucleares, citoplasmáticas e moleculares que tornam o gameta feminino apto a ser fecundado (SMITZ et al., 2004). A maturação nuclear (Figura 6) ocorre sem influência das células do *cumulus* e é caracterizada pela ruptura da vesícula germinativa, que compreende os processos de condensação da cromatina e dissolução da membrana nuclear (ANGUITA et al., 2007). Concomitantemente à maturação nuclear, o citoplasma também sofre alterações na modulação da síntese de proteínas e reorganização de organelas citoplasmáticas, como redução do tamanho do Complexo de Golgi, aumento gradativo de lipídeos, compactação do nucléolo e alinhamento dos grânulos corticais próximos à membrana do oócito. Estes últimos possuem grande importância na prevenção da polispermia (FERREIRA et al., 2009).

Todos esses eventos moleculares e bioquímicos que ocorrem no oócito até atingir a maturação devem ser estritamente controlados para que um gameta feminino viável esteja disponível para fertilização e desenvolvimento embrionário subsequente (WRENZYCKI & STINSHOFF, 2013). Sendo assim, a etapa de maturação que ocorre em um período de 22 a 24 horas tem recebido a atenção de pesquisadores que visam melhorar os resultados da produção *in vitro* de embriões (PARRISH, 2014).

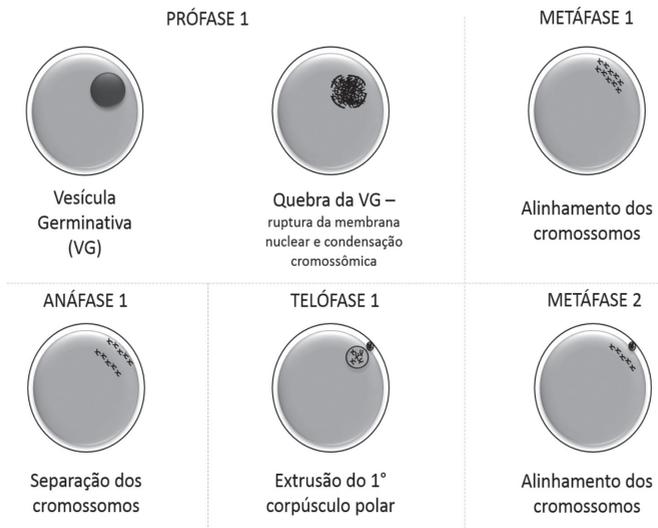


Figura 6. Etapas da maturação nuclear.

Durante o crescimento do oócito há um aumento da taxa de mitose das células da granulosa, contidas no folículo, que irão diferenciar-se em células do *cumulus* (FAIR, 2003). Estas células estão ligadas aos oócitos pelas junções tipo *gap*, atuando na transferência de íons, metabólitos e aminoácidos que regulam o crescimento e maturação do oócito (FAIR, 2003; KRISHER, 2004). As células do *cumulus* também modulam a atividade transcricional do oócito e facilitam a penetração espermática durante a fecundação (DE LA FUENTE e EPPIG, 2001). Por outro lado, os oócitos secretam fatores que induzem a proliferação e expansão dessas células (CHAND et al., 2006). Em

ócitos imaturos, as células do *cumulus* estão compactas e durante a maturação iniciam a secreção de ácido hialurônico o que causa a mucificação e separação das células, ocasionando a sua expansão (FULOP et al., 2003).

O meio de maturação apresenta gonadotrofinas (FSH e LH) que simulam o ambiente folicular pré-ovulação, para influenciar a expansão de células do *cumulus* e a maturação nuclear, através da ativação de AMPc e outros mensageiros intracelulares (revisado por LI & ALBERTINI, 2013).

A atmosfera gasosa geralmente utilizada em sistemas de MIV é de 5% de CO<sub>2</sub> e 20% de O<sub>2</sub>, com umidade saturada. O CO<sub>2</sub> é utilizado para controlar o potencial de hidrogênio (pH) dos meios tamponados com bicarbonato (BAVISTER, 1995). Por outro lado, a tensão de O<sub>2</sub> no fluido folicular e na tuba uterina é menor (1,5 a 8,5%) quando comparado ao ar atmosférico (20%) (BAVISTER, 1995). Portanto, alguns sistemas de PIVE já utilizam mistura de gases contendo 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>.

Meios utilizados:

- PBS + Soro Fetal Bovino (SFB)
- MEIO DE LAVAGEM (TCM199 com sais de Hanks, tampão HEPES, antibiótico – penicilina e estreptomicina- e soro fetal bovino)
- MEIO DE MATURAÇÃO (TCM199 com sais de Earle suplementado com l-glutamina, antibiótico –penicilina e estreptomicina-, bicarbonato de sódio, piruvato de sódio, hormônios –FSH, LH e estradiol- e soro fetal bovino).

Procedimentos:

#### *1 – Preparação da placa de maturação*

- Em uma placa de Petri fazer gotas de 100 µl de meio de maturação e recobri-las com óleo mineral.
- É necessário que a placa de maturação permaneça na estufa incubadora por pelo menos duas horas antes da transferência dos óocitos para mesma, para a estabilização do meio.

*II - Rastreamento de oócitos*

- O fluido folicular será submetido à lavagem e filtração, com auxílio de filtro apropriado, capaz de reter os oócitos.
- O material retido no filtro será transferido para placa de Petri estéril e descartável, onde serão rastreados os oócitos.
- A manipulação das estruturas desta etapa em diante será realizada com auxílio do estereomicroscópio, no interior da capela com fluxo laminar.
- As estruturas encontradas serão transferidas para outra placa contendo duas gotas de meio de lavagem, onde permanecerão para que em seguida sejam selecionados de acordo com a qualidade.

*III - Seleção*

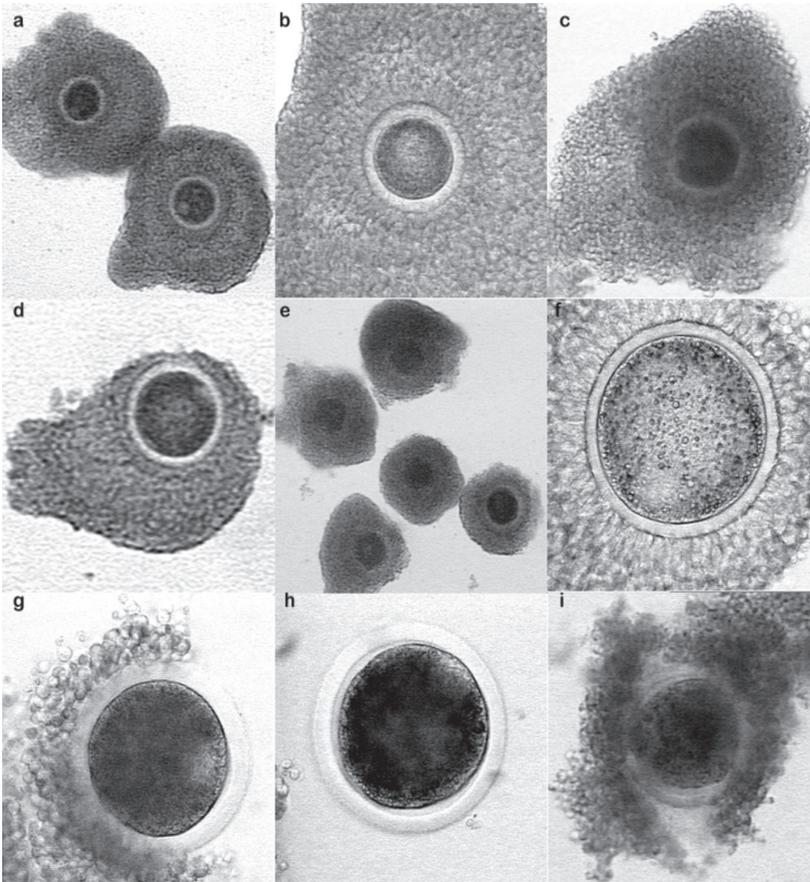
- A seleção é baseada em características do cumulus e do citoplasma do oócito como descrito na Tabela 1 e Figura 7.
- Serão selecionados oócitos classificados como grau I, II e III.

*IV - Maturação in vitro*

- Os oócitos selecionados serão lavados em gota de meio de maturação e em seguida transferidos para gotas de 100  $\mu$ l de meio de maturação contidas em placa de Petri recobertas com óleo mineral, previamente estabilizadas.
- A maturação dos oócitos será realizada em gotas de por um período de 22 a 24 horas, em estufa incubadora com temperatura de 39,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 95% de umidade.

**Tabela 1.** Critérios adotados no CESM para a classificação morfológica dos oócitos recuperados.

Qualidade	Descrição
Grau I	Oócitos com mais de três camadas de células compactas do <i>cumulus</i> , e citoplasma regular.
Grau II	Oócitos com uma a três camadas de células do <i>cumulus</i> , citoplasma regular ou apresentando granulações finas.
Grau III	Oócitos apresentando menos de três camadas do <i>cumulus</i> ou parcialmente desnudos, citoplasma irregular.
Grau IV	Desnudos (oócitos sem células do <i>cumulus</i> ) ou em degeneração (com <i>cumulus</i> expandido e citoplasma heterogêneo apresentando granulações severas).



**Figura 7.** Complexos cumulus-oócito bovinos. Ooócitos grau I (a,b,c,e), grau II (d,f), grau III (g) e grau IV (h,i).

### **Fecundação *in vitro* (FIV)**

A fecundação *in vitro* ocorre através da incubação de oócitos maduros com espermatozóides capacitados, em meio de fecundação. Neste momento, ocorre a combinação do material genético dos gametas e a formação do zigoto. Para adquirir competência para fecundação, o espermatozóide precisa sofrer capacitação. Este processo ocorre pela remoção de fatores decapacitantes presentes no fluido seminal. *In vivo*, o processo acontece durante a passagem do espermatozóide pelo trato genital feminino, e envolve a desestabilização da membrana plasmática e hiperativação espermática. *In vitro*, o processo de

capacitação é desencadeado por glicosaminoglicanas (como a heparina), que são adicionadas nos meios de fecundação. Ao entrar em contato com o oócito, na presença de cálcio extracelular, o espermatozóide capacitado se liga a receptores presentes na zona pelúcida (ZP3) e sofre a reação acrossômica, determinada pela fusão das membranas plasmática e acrossomal. Assim, o conteúdo acrossômico é liberado, e somado à motilidade progressiva espermática, auxilia a penetração do espermatozóide e ligação aos receptores ZP2. Após penetrar o espaço perivitelino, a membrana plasmática do espermatozóide se funde à membrana vitelina, havendo liberação de cálcio no interior do oócito. Este influxo de cálcio promove a liberação do conteúdo dos grânulos corticais e reação zonal, que determina o enrijecimento da zona pelúcida e bloqueio à poliespermia (VARAGO et al., 2008).

Na maioria dos laboratórios, utiliza-se sêmen congelado para o processo de fecundação *in vitro* em bovinos. No entanto, após o descongelamento, é necessário selecionar os espermatozóides vivos e capazes de fecundar. Esta seleção é realizada, na maioria das vezes, pela separação em gradiente de Percoll, embora outros sistemas possam ser utilizados como o "swim-up" ou o lavado espermático. O percoll é composto por partículas de sílica coloidal coberto com polivinilpirrolidona, preparado em diferentes concentrações para formar um gradiente descontínuo de duas ou três fases (90, 45 e 30%) para separação espermática (GONSALVES et al., 2002).

Meios utilizados:

- SPTL
- PERCOLL
- FERT-TALP

Procedimentos:

#### *1 - Preparação da placa de fecundação*

- Em uma placa de Petri preparar gotas de 10  $\mu$ L de meio de fecundação, recobri-las com óleo mineral e equilibrar em estufa incubadora por duas horas, antes do início do período de fecundação.

## *II – Preparação do Sêmen*

### *II. I - Swim-up*

- Adicionar 1 mL de SPTL em um tubo de fundo cônico de 15 mL, tampar, sem vedar, a rosca dos tubos e manter em estufa incubadora para estabilizar o meio.
- Descongelar a palheta de sêmen em banho-maria a 37 °C por 30 segundos. Em seguida, verter o conteúdo da palheta cuidadosamente no fundo do tubo contendo SPTL e mantê-lo apoiado dentro de um bécker em posição inclinada. Lembrar de retirar uma pequena amostra de sêmen para analisar a motilidade e vigor do sêmen antes da incubação em estufa.
- Manter o tubo Falcon com o sêmen por 1 hora em estufa incubadora nas mesmas condições da maturação.
- Após 1 hora, remover o sobrenadante e transferi-lo para um novo tubo Falcon previamente aquecido.
- Remover uma segunda amostra de sêmen para analisar motilidade e vigor.
- Centrifugar o tubo Falcon com o sêmen por 8 minutos a 1.200 RPM em centrífuga sorológica.
- Remover o sobrenadante e ressuspender o *pellet* com meio FERT-TALP (previamente equilibrado na incubadora) para um volume final de 100  $\mu$ L.
- Deixar o tubo na incubadora enquanto se processa a contagem espermática.

### *II. II - Mini Percoll*

- Preparar um tubo cônico com capacidade de 1,5 mL com gradiente de Percoll, pela adição de 250  $\mu$ L de Percoll 90% e, sobre esta camada, depositar 250  $\mu$ L de gradiente Percoll 45%, vagarosamente, de maneira que as duas camadas não se misturem.
- Equilibrar a temperatura e atmosfera do gradiente de Percoll em incubadora por aproximadamente 1 hora antes do uso.
- Após o descongelamento do sêmen, o conteúdo da palheta deve ser depositado sobre as camadas de Percoll previamente aquecidas (não deixar o sêmen se misturar com as camadas de Percoll).
- Centrifugar o tubo em uma microcentrífuga a 8.000 RPM, por 7 minutos.

- Remover o sobrenadante, ressuspender o *pellet* com 1 mL de meio FERT e centrifugar novamente por 5 min, utilizando a força de 3.200 RPM.
- Remover 60  $\mu\text{L}$  do *pellet* formado e transferir para outro *ependorf*.
- Transferir 5  $\mu\text{L}$  para *ependorf* contendo 50  $\mu\text{L}$  de meio FERT para análise de motilidade progressiva.

### II. III – Contagem espermática e ajuste da concentração do sêmen

Diluir 5  $\mu\text{L}$  da amostra do sêmen em 250  $\mu\text{L}$  de água e homogeneizar bem.

- Contar os espermatozoides em 5 retículos da câmara de Neubauer para se determinar o volume de meio FERT-TALP a ser adicionado. Ajustar a concentração a ser utilizada na gota de fecundação por meio do seguinte cálculo:

$$\text{n}^\circ \text{ de sptz contados} \times (\text{motilidade}/1.000) \times 50 \mu\text{L} (\text{volume sedimento}) \\ = \text{volume final (em } \mu\text{L)}$$

- O volume (em  $\mu\text{L}$ ) de meio FIV-gotas a ser adicionado, no microtubo contendo sêmen e heparina (ou FIV-gotas), é a diferença entre o volume final e o volume sedimento (50  $\mu\text{L}$ ).

$$\text{volume final} - 50 \mu\text{L} (\text{volume sedimento}) = \text{volume } (\mu\text{L}) \text{ de meio FIV -} \\ \text{gotas a ser adicionado}$$

- Adicionar 4  $\mu\text{L}$  (ou 8  $\mu\text{L}$  se o sêmen foi processado com TL-Sêmen) desta mistura em cada microgota da placa de FIV, o que dará uma concentração de  $100 \times 10^3$  espermatozóide por microgota de FIV, que corresponderá a  $5 \times 10^3$  espermatozoides por oócito.

**Obs:** verificar, sob lupa, se a microgota contém mesmo os espermatozoides.

\*Dedução da fórmula utilizada para ajuste de concentração espermática

$$\frac{n}{\frac{1}{10} \times \frac{1}{5} \times \frac{1}{50}} = [\ ] \text{ de sptz/mm}^3 = n \times 2.500$$

$$[\ ] \text{ de sptz/mm}^3 \text{ viáveis} = n \times 2.500 \times \text{motilidade (\%)}$$

$$[\ ] \text{ inicial} \times V \text{ inicial} = [\ ] \text{ final} \times V \text{ final}$$

$$n \times 25 \times 10^2 \times \text{motilidade}/100 \times 50 \mu\text{L} = 25 \times 10^3 \times V \text{ final}$$

$$V \text{ final} = n \times \text{motilidade}/1.000 \times 50 \mu\text{L}$$

$$V \text{ final} = \frac{n \times 25 \times 10^2 \times \text{motilidade}/100 \times 50 \mu\text{L}}{25 \times 10^3}$$

$$\text{Obs: [ ] final} = 25 \times 10^6 \text{ spz/mL} = 25 \times 10^3 \text{ spz/mm}^3$$

### III – Fecundação *in vitro*

- Após ajuste da concentração espermática transferir, no máximo 20 oócitos por gota, adicionar volume espermático e completar com FERT para volume final de 50 a 100  $\mu\text{L}$ , de acordo com o protocolo adotado no laboratório (ex para 50  $\mu\text{L}$ : gota de 10  $\mu\text{L}$  + 20  $\mu\text{L}$  de sêmen + 10  $\mu\text{L}$  de FERT com oócitos = 50  $\mu\text{L}$  FERT).
- Antes de transferir os oócitos para gota de fecundação, lavar, ao menos duas vezes, em meio FERT previamente equilibrado e aquecido.
- Incubar os oócitos juntamente com os espermatozoides por um período de 18 a 22 h, nas mesmas condições de atmosfera, temperatura e umidade adotadas para a maturação *in vitro*.

### Cultivo *in vitro* (CIV)

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

A qualidade dos embriões produzidos *in vitro* é inferior a dos embriões produzidos *in vivo*. Embriões derivados de PIVE geralmente apresentam coloração mais escura em seu citoplasma e menor densidade, devido ao

seu alto conteúdo lipídico (FAIR et al., 2001). Estes embriões apresentam também uma zona pelúcida mais frágil, uma alta incidência de anormalidades cromossômicas (SLIMANE et al., 2000), falta de compactação da massa celular, formação prematura de blastocele, alteração na razão de massa celular interna em relação às células trofoblásticas, alterações na expressão gênica e metabolismo celular (LONERGAN et al., 2006).

Meios utilizados:

- SOF suplementado com SFB, BSA, aminoácidos, piruvato, lactato e glutamina

Procedimentos:

*I – Preparação da placa de cultivo*

- Em uma placa de petri preparar gotas de 100  $\mu$ L de meio de cultivo (SOF), recobri-las com óleo mineral e manter em estufa incubadora por pelo menos duas horas antes do início do cultivo.

*II - Desnudamento Parcial de oócitos*

- Fazer o desnudamento parcial das estruturas contidas na gota de fecundação com o auxílio de uma pipeta de 100  $\mu$ L, de forma a manter algumas células aderidas aos oócitos para que a partir destas se forme a monocamada.

*III – Cultivo in vitro*

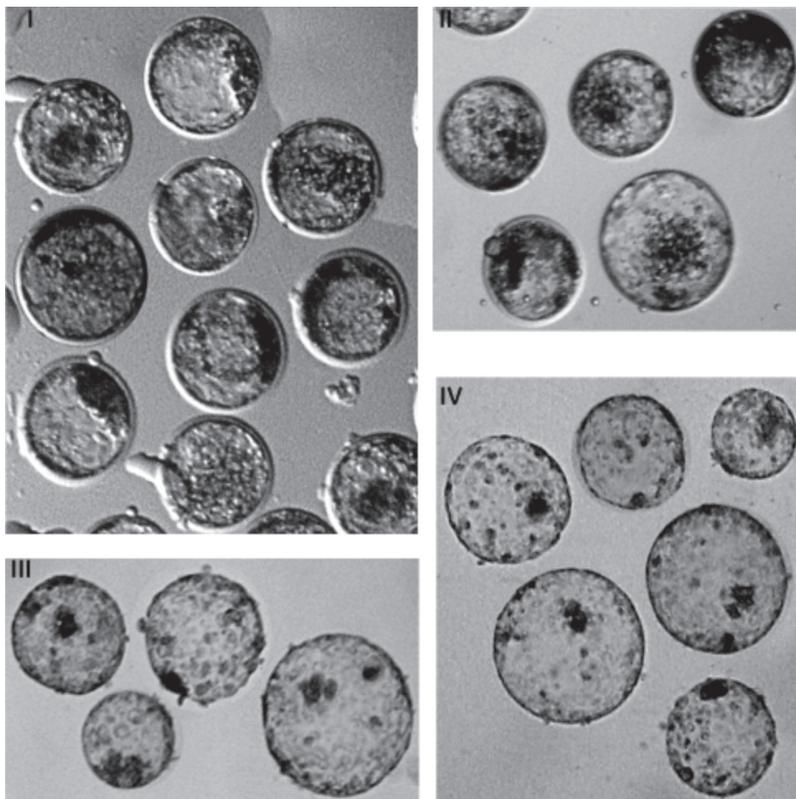
- Retirar os possíveis zigotos parcialmente desnudos das gotas de fecundação e lavar por no mínimo duas vezes em meio SOF, previamente estabilizado.
- Transferir de 15 a 20 estruturas para gotas de meio de cultivo.

*IV - Avaliação da taxa de clivagem*

- Em um período de 48 horas após o início do cultivo, será realizada a troca de 50% do volume de cada gota onde se encontram os embriões. Para tal, será necessária a estabilização do meio SOF por pelo menos duas horas de antecedência.
- Após a troca do meio, será realizada a avaliação de quantas estruturas se dividiram e o número de células presente em cada uma.

#### V - Avaliação da taxa de blastocisto

- No sétimo dia após o início do cultivo, será realizada a avaliação da formação de blastocistos (inicial, expandido, eclodido), e qual a proporção de cada estágio no qual se encontram (Figura 8).



**Figura 8.** Blastocistos produzidos *in vitro* no dia 7 (I e II) e 9 (III e IV) após a fecundação. Nas figuras I e II, estão presentes blastocistos e blastocistos expandidos, e nas figuras III e IV, blastocistos eclodidos.

### Classificação dos embriões

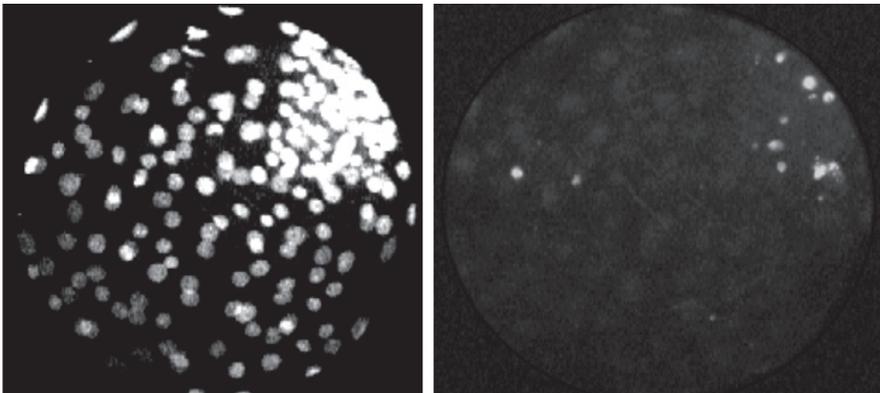
A classificação morfológica é uma ferramenta indispensável para a seleção dos embriões aptos à transferência e criopreservação. Estruturas que se apresentam viáveis, aptas ao desenvolvimento pós-implantacional e com maior tolerância à congelação normalmente correspondem a estruturas com boa aparência morfológica. A descrição dos critérios sugeridos pela IETS encontra-se disposta na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação embrionária quanto à qualidade.

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

Fonte: Adaptado do Manual da *International Embryo Transfer Society*, 3ª edição, traduzida para o português em 1999.

Outras maneiras de se detectar a qualidade dos embriões produzidos é a quantificação da morte celular programada (apoptose), a contagem do número de células dos embriões, além da expressão de genes importantes para o desenvolvimento. Porém, estas técnicas não são possíveis em embriões vivos, servindo mais como indicadoras da qualidade do processo de produção de embriões. Assim, servem como controle de qualidade do processo, mas inutilizam os embriões analisados, que não podem ser transferidos. Imagens da contagem de células e quantificação de células mortas estão dispostas na Figura 9.



**Figura 9.** Blastocisto corado com HOECHST 33342 para contagem do número total de células (esquerda). À direita, o mesmo embrião, com as células em processo de morte programada (apoptose) coradas pelo ensaio TUNEL.

## **Criopreservação de embriões**

### **Importância**

A criopreservação de embriões é uma biotécnica que torna possível o controle racional das atividades da biologia da reprodução. A parada do desenvolvimento embrionário no estágio de blastocisto permite a programação de diversas etapas subsequentes, otimizando o destino destes embriões. Dentre os aspectos de controle, o manejo de receptoras seria o mais evidente. Em qualquer programa de transferência de embriões, ou temos um número pequeno de receptoras ou o excesso delas, por ser muito improvável a estimativa precisa do número de blastocistos que será produzido (KHURANA & NIEMANN, 2000).

Outro ponto crítico na PIVE é o transporte e a comercialização destes embriões. Congelados, podem ser trabalhados de forma semelhante a doses de sêmen. A venda da genética se tornaria muito mais fácil e prática, com benefícios que se estenderiam desde a sanidade dos rebanhos, por não haver a necessidade de introdução de animais receptores, até ganhos genéticos extremos, pela completa substituição do material genético em apenas uma geração.

### **Técnica**

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

Embriões bovinos são estruturas com apenas cerca de 90 células, e envolvidas por uma forte membrana denominada zona pelúcida, o que torna o processo de criopreservação bastante complexo pois a perda ou injúria destas células pode ser irreparável, principalmente se atingir algum tipo celular específico, como a massa celular interna ou trofotoderma. Por isso, neste caso, o potencial de sobrevivência das células é um aspecto essencial – característica denominada criotolerância (SHAW et al., 2000).

A primeira técnica proposta para criopreservação de embriões com sucesso foi a congelação lenta. O princípio da congelação lenta é promo-

ver o congelamento do meio externo ao embrião, promovendo desidratação gradual do blastocisto até que o mesmo atinja a temperatura de vitrificação da matriz intracelular. Para tanto, os blastocistos são expostos a baixas concentrações de crioprotetores (moléculas que protegem os embriões, reduzindo o ponto de solidificação do meio), e a temperatura é reduzida a -5 a -7 °C para equilíbrio. Em seguida, as palhetas sofrem o *seeding* para iniciar a congelação extracelular e a temperatura é diminuída gradualmente através de uma curva de -0.3 a -0.5 °C/minuto, até atingir temperaturas da ordem de -30 a -65 °C, quando as palhetas são imersas em nitrogênio líquido (VAJTA & NAGY, 2006).

Apesar de funcionar muito bem para embriões produzidos *in vivo* (provenientes de colheita de vacas superovuladas), com taxas de aproximadamente 41,5% de prenhez, em embriões produzidos *in vitro* (provenientes da fecundação *in vitro*) os índices são insatisfatórios. Neste contexto, a técnica de vitrificação reemergiu como uma alternativa interessante para a criopreservação de embriões produzidos *in vitro* (LIEBERMANN et al., 2002).

O princípio da congelação rápida é promover a desidratação do embrião utilizando soluções osmóticas, e então, induzir a diminuição drástica da temperatura embrionária, transpondo a etapa de cristalização. São muito importantes três aspectos neste processo: a taxa de resfriamento, a viscosidade do meio de vitrificação, que deve ser alta para diminuir as chances de cristalização, e o volume, que deve ser o menor possível para permitir melhor transferência de calor (VAJTA, 2000).

Diversos protocolos utilizando o princípio de congelação rápida para promover vitrificação foram desenvolvidos. As diferenças encontradas nas taxas de sobrevivência após a vitrificação entre diferentes autores e protocolos refletem o estágio, origem, a qualidade e a razão volume/superfície dos embriões – que influencia a penetração de crioprotetores (VAJTA & NAGY, 2006).

O procedimento "*open pulled straw*" (OPS), proposto por Vajta, permite que se alcance taxas muito altas de resfriamento e aquecimento (até

20,000 °C/min), e pequeno contato com os crioprotetores concentrados (menos de 30 segundos). A técnica permite que se evite a injúria causada pela formação de cristais e toxicidade/danos osmóticos (VAJTA et al, 1999).

As pesquisas relacionadas à criopreservação de embriões bovinos utilizam a porcentagem de eclosão para avaliar a recuperação destas estruturas após as etapas de congelamento ou vitrificação. Nesse contexto, as condições de cultivo *in vitro* são responsáveis pelas alterações que diminuem a viabilidade do embrião tanto antes como após a criopreservação. Sendo assim, o estudo dos componentes do meio de cultivo, visando melhorar o resultado de eclosão após criopreservação é essencial para o aprimoramento desta técnica e para complementar os resultados da PIVE (VAJTA & NAGY, 2006).

### **Procedimento de vitrificação**

1. O procedimento aqui especificado é baseado na técnica desenvolvida por Vajta et al. (1999), com pequenas modificações. Descreveremos o uso de palhetas esticadas e abertas (*Open Pulled Straws* – OPS) para envase dos embriões.
2. Selecionar blastocistos e blastocistos expandidos no sétimo dia de desenvolvimento (D7).
3. Lavar os embriões em meio base (SOF suplementado com 20% de SFB), aquecido a 37 °C.
4. Transferir os embriões para meio base acrescido de 7,5% etilenoGlicol e 7,5% de DMSO por 3 minutos.
5. Transferir os embriões para meio base acrescido de 16,5% EG e 16,5% DMSO. Deixar os embriões por tempo máximo de 40 segundos.
6. Envasar os embriões, individualmente, em OPS, em um volume máximo de 2  $\mu$ L da solução, e, submergí-los, imediatamente, em nitrogênio líquido, onde serão armazenados.

### **Reaquecimento dos blastocistos**

Para o reaquecimento, três soluções serão utilizadas: meio SOF suplementado com 20% de SFB adicionado de 1,0 M/ 0,5 M/ e 0 M de sacarose.

1. Imergir a OPS em meio com 1 M de sacarose a 37 °C por 1 min.
2. Transferir os embriões para solução com 0,5 M de sacarose por 5 min.
3. Em seguida, transferir os embriões para meio livre de sacarose (0 M) por 10 minutos. A última etapa consiste no envase dos embriões em palhetas para serem transferidos para receptoras.

## Literatura Complementar

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

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals**. 7. ed. Maryland: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 528 p.

PALMA, G.A. **Biotechnology de la Reproducion**. Local: Argentina. Ediciones Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria (INTA), 2001. p. 149-197.

SENGER, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2. ed. Local: Moscow, Indiana. Current Conceptions, Inc., 2003. p. 284-296.

## Referências

AHUMADA, C. J.; SALVADOR, I.; CEBRIAN-SERRANO, A.; LOPERA, R.; SILVESTRE, M. A. Effect of supplementation of different growth factors in embryo culture medium with a small number of bovine embryos on in vitro embryo development and quality. **Animal**, v. 7, p. 455-462, 2013.

ANGUITA, B.; JIMENEZ-MACEDO, A. R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M. T. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v. 67, p. 526-536, 2007.

BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, v. 1, n. 2, p. 91-148, 1995.

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

CHAND, A. L.; PONNAMPALAM, A. P.; HARRIS, S. E; WINSHIP, I. M.; SHELLING, A. N. Mutational analysis of BMP15 and GDF9 as candidate genes for premature ovarian failure. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 4, p. 1009-1012, 2006.

DE LA FUENTE, R.; EPPIG, J. J. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. **Developmental Biology**, v. 229, n. 1, p. 224-236, 2001.

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

FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTELL, D. C.; HYTTEL, P.; WARD, F. A.; BOLAND, M. P. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 58, p. 186-195, 2001.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 203-216, 2003.

Ferreira, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. A. A. S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, p. 836-848, 2009.

FULOP, C.; SZANTO, S.; MUKHOPADHYAY, D.; BARDOS, T.; KAMATH, R. V.; RUGG, M. S.; DAY, A. J.; SALUSTRI, A.; HASCALL, V. C.; GLANT, T. T.; MIKECZ, K. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. **Development**, v. 130, p. 2253-2261, 2003.

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

HASLER, J. F. The Current Status of Oocyte Recovery, In Vitro Embryo Production, and Embryo Transfer in Domestic Animals, with an Emphasis on the Bovine. **J. Anim. Sci.**, v. 76, p. 52-74, 1998.

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

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. **Biol. Reprod.**, v. 62, p. 847-856, 2000.

KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journal Animal Science**, v. 82, p. 14-23, 2004.

LI, R.; ALBERTINI, D. F. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, v. 14, p. 141-152, 2013.

LIEBERMANN, J.; NAWROTH, F.; ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; RAHIMI, G.; TUCKER, M. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1671, 2002.

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

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A. C. Effect of cul-

ture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 137-152, 2006.

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

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

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

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

SENGER, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2. ed. Local: Moscow, Indiana. Current Conceptions, Inc., 2003. p. 284-296. (falta acrescentar a cidade)

SHAW J. M.; ORANRATNACHAI A.; TROUNSON A O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue, **Theriogenology**, v. 53, p. 59-72, 2000.

SLIMANE, W.; VAIMAN, D.; GODARD, S.; VAIMAN, A.; CRIBIU, E.; RENARD, J. P. A repetitive probe for FISH analysis of bovine interphase nuclei. **Genet. Sel. Evol.**, v. 32, p. 217-225, 2000.

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

VAJTA, G.; RINDOM, N.; PEURA, T. T.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after Open Pulled Straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**, v. 52, p. 939-948, 1999.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 357-364, 2000.

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

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 32, p. 100-109, 2008.

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

