UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Curso de Medicina Veterinária

Gustavo Adolfo Costa Castro

PRINCIPAIS FATORES QUE INTERFEREM NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Unaí/ MG
2020

Gustavo Adolfo Costa Castro

PRINCIPAIS FATORES QUE INTERFEREM NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Bacharel.

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Jeanne Broch Siqueira

Unaí/MG
2020

Gustavo Adolfo Costa Castro

PRINCIPAIS FATORES QUE INTERFEREM NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

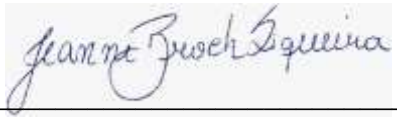
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Bacharel.

Orientadora: Profª. Drª. Jeanne Broch Siqueira

Data de aprovação 27/11/2020

Profª. Drª. Denise Silva Okano
Centro Universitário Atenas-UniAtenas

Prof. Dr. Eduardo Gorzoni Fioratti
Instituto de Ciências Agrárias – UFVJM



Profª. Drª. Jeanne Broch Siqueira
Instituto de Ciências Agrárias – UFVJM

Unaí/MG
2020

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica reprodutiva que busca o melhoramento genético aliado a maximização da capacidade reprodutiva animal. A produção de embriões em ambiente laboratorial consiste na coleta de ovócitos (ovum pick-up - OPU) de fêmeas bovinas doadoras, que são posteriormente fertilizados com espermatozoides de touros geneticamente selecionados e então transferidos a fêmeas receptoras. Esse processo deve ser bem planejado para que seus resultados não sejam comprometidos e se extraia o máximo de potencial que estes podem oferecer ao produtor rural. A seleção de fêmeas é parte fundamental desse planejamento, a coleta dos gametas no estágio e forma correta, além da idade da doadora podem influenciar no sucesso da obtenção de ovócitos de boa qualidade, tanto em parâmetros quantitativos quanto qualitativos. Os resultados obtidos por meio da PIVE podem variar de acordo com diversos fatores (espécimes, clima, condições nutricionais e de técnica, entre outros). Neste trabalho foi feita uma revisão de literatura para identificar esses fatores e determinar como eles interferem nos resultados obtidos com essa biotécnica.

Palavras-chave: Biotécnica Reprodutiva. Melhoramento Genético. Produção in vitro de embrião. Reprodução animal.

ABSTRACT

In vitro embryo production (IVP) is a reproductive biotechnology that seeks genetic improvement combined with maximizing animal reproductive capacity. The production of embryos in a laboratory environment consists of the collection of oocytes from donor females, which are then fertilized with sperm from genetically selected bulls and then transferred to recipient females. This process must be well planned so that its results are not compromised and the maximum potential that these can offer to the rural producer is extracted. The selection of females is a fundamental part of this planning, the collection of genetic material at the stage and correct form, in addition to the age of the donor can influence the success of obtaining good quality oocytes, both in quantitative and qualitative parameters. The results obtained through IVP can vary according to several factors (specimens, climate, nutritional and technical conditions, among others). In this work, a literature review was carried out to identify these factors and determine how they interfere with the results obtained with this biotechnology.

Keywords: Reproductive Biotechnics. Genetical enhancement. *In vitro* embryo production. Animal reproduction.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 5

2. REVISÃO DE LITERATURA 7

2.1 Produção *in vitro* de embriões 7

2.1.2 Coleta de ovócitos para a PIVE 7

2.1.2Maturação *in vitro* (MIV) 11

2.1.3 Fertilização *in vitro* (FIV) 12

2.1.4 Cultivo ou co-cultivo *in vitro* (CIV) 14

2.2 Fatores que interferem negativamente na PIV 17

2.2.1 Fatores relacionados às fêmeas 17

2.2.2 Fatores relacionados a raça 19

2.2.3 Fatores relacionados a nutrição 19

2.2.4 Fatores relacionados ao método 19

2.2.5 Fatores relacionados ao clima 20

2.2.6 Aspéctos relacionados ao sêmen 21

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS 22

REFERÊNCIAS 23

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a atividade leiteira brasileira evoluiu de forma contínua, resultando no crescimento consistente da produção, que colocou o país como um dos principais do setor no mundo. Segundo o levantamento do portal Notícias Agrícolas (2020) a produção nacional de leite no ano de 2019 foi de 34,8 bilhões de litros, isso representa um aumento de 2,7%, sendo o segundo ano de maior produção registrado desde 1974. O estado líder na produção de leite é Minas Gerais, com volume de 27,1% do total produzido no Brasil, tendo como base um rebanho de 3,1 milhões de vacas ordenhadas. São propriedades e estabelecimentos de todos os tamanhos que sustentam a atividade leiteira com a marca da diversidade.

Atualmente, na reprodução animal do território nacional, destacam-se técnicas com objetivo de aumentar a produção de animais de alto padrão. Desta forma, a incorporação de biotecnologias relacionadas a reprodução animal com a finalidade de maximizar a eficiência reprodutiva, vem aumentando o potencial genético do rebanho com maior número de progênies em menor intervalo de tempo (RENESTO, 2004).

Nesse contexto, a produção *in vitro* de embriões (PIVE), surge na década de 90 como uma biotecnologia que possui estreita relação com o melhoramento genético combinada com o melhor aproveitamento reprodutivo dos animais. Atualmente, é possível afirmar que a PIVE é uma técnica economicamente viável e, se bem aplicada na pecuária, eleva os índices reprodutivos de fêmeas, viabiliza maior seleção genética, reduz o intervalo de tempo entre gerações e facilita a disponibilidade de animais para reposição (PENNA, 1993). Sabe-se que a seleção genômica embrionária vem atender a um importante nicho de mercado, visto que o Brasil é o maior produtor de embriões bovinos do mundo (cerca de 400 mil por ano) (NEIVA, 2018).

Apesar de ter sido desenvolvida mais recentemente, a técnica de PIVE já está disponível para rebanhos comerciais e é bastante utilizada em sistemas de produção de leite do Brasil. O aumento da demanda por genética superior, a baixa disponibilidade de animais selecionados para produção de leite e a limitada capacidade de multiplicação dos mesmos por meio das outras biotécnicas, são os principais fatores responsáveis pela disseminação da PIVE no Brasil.

A PIVE possibilita maior pressão de seleção animal por meio da realização de coletas de ovócitos seriadas (intervalos de 7 a 15 dias) de fêmeas doadoras de alto padrão, sem causar prejuízos no recrutamento de novas ondas de crescimento folicular e sem comprometer a fertilidade destes animais. Por meio da monta natural, uma fêmea é capaz de produzir apenas um bezerro por ano. Por meio da transferência de embriões (TE), é possível obter em torno de

12 bezerros por ano. Já na PIVE, 40 a 50 produtos provenientes de uma única fêmea doadora de ovócitos podem ser obtidos por ano (LEITE et al., 2019).

De acordo com Gonçalves e Viana (2019), no ano de 2017 foram produzidos 375.503 embriões bovinos no Brasil. Verifica-se intensa retração da PIVE no gado de corte e grande expansão da técnica em raças leiteiras, devido à maior disponibilidade de sêmen sexado e adoção dessa ferramenta como estratégia de produção de fêmeas mestiças de alta produção. Como resultado desta inversão de mercado, ocorreu uma redução nos custos de produção de embriões. A preparação e manutenção das receptoras passou a representar o principal ônus no custo total do processo, sendo mais vantajoso gerar um excedente de embriões para garantir o aproveitamento máximo das receptoras disponíveis.

Entretanto, podem ocorrer variações nos resultados de PIVE em decorrência de fatores como a resposta folicular da doadora, relacionadas diretamente com a fertilidade e viabilidade embrionária. Nesse sentido, para evitar perdas, tanto a campo quanto no laboratório, procedimentos como avaliação e manipulação hormonal das doadoras e receptoras, qualidade da dieta, habilidade dos técnicos, controle do estro, manejo geral da propriedade, escolha do sêmen, diagnóstico precoce de gestação, perdas embrionárias, sexagem fetal com o uso de ultrassonografia e controle de qualidade do laboratório devem ser realizados (MORAES, 1990; ARMSTRONG, 1993).

Observa-se então a necessidade de pesquisas para otimizar a eficiência da PIV, aumentando desta forma a quantidade de blastocistos e gestações produzidas em relação ao número de ovócitos que são aspirados. Assim, objetiva-se com a presente revisão, destacar os principais fatores que interferem na produção *in vitro* de embriões bovinos obtidos por aspiração folicular *in vivo* de fêmeas doadoras de ovócitos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) associada com a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom – *OvumPick-Up* (OPU) proporcionam aumento significativo na seleção e melhoramento genético e na exploração do potencial reprodutivo do rebanho com finalidade de produzir animais superiores aos seus progenitores (VARAGO et al., 2008). Após a obtenção dos ovócitos, realiza-se a maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo ou co-cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e embriões fora do corpo do animal (GONÇALVES et al., 2008).

A PIVE viabiliza a utilização da fêmea para fins reprodutivos mesmo em momentos mais críticos onde, fisiologicamente, por técnicas convencionais, isso não seria possível. Proporciona utilização de fêmeas gestantes (até o terceiro mês) e no período pós-parto, ou até mesmo obtenção de ovócitos de animais muito novos (a partir do sexto mês de idade) ou mais velhos. Por meio da aplicação da PIVE é possível produzir maior número de embriões em menos tempo, utilizar diferentes touros, e como em outras biotécnicas a utilização de sêmen sexado (BRACKETT; ZUELKE, 1993; SANTL et al., 1998; BELTRAN, BUENO, 2008).

Embora apresente inúmeros benefícios, a técnica de PIVE é considerada de alto custo por embrião, devido à baixa taxa de blastócitos produzidos, além disto, é uma técnica que não apresenta resultados satisfatórios quando associada a congelação, desta forma, os embriões devem ser transferidos a fresco para que se tenha taxa de prenhez satisfatória. Alternativas como o estudo da incorporação de agentes antioxidantes (L-ergotioneína ou dimetilglicerina) aos meios de cultura promoveram o aperfeiçoamento da qualidade de embriões bovinos (TAKAHASHI et al., 2016; ZULLO et al., 2016) assim como aumentam a resistência dos embriões à criopreservação (ZULLO et al., 2016).

2.1.1 Coleta de ovócitos para a PIVE

A coleta de ovócitos pode ser realizada na fêmea após a morte por meio da punção folicular em ovários obtidos em abatedouro ou com o animal vivo por meio da laparotomia ou da laparoscopia via flanco, por laparoscopia vaginal ou pela técnica da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom - OPU (VARAGO et al., 2008). Atualmente, a técnica de aspiração folicular transvaginal é o método mais aceitável para a obtenção de ovócitos de boa

qualidade *in vivo* na espécie bovina, embora exija uma maior agilidade do operador (BOLS et al., 2004; GONÇALVES et al., 2007; ANDRADE et al., 2012).

Aspiração folicular a partir de ovários coletados em abatedouro ocorre imediatamente após o abate, onde os ovários coletados são transportados ao laboratório, ocorrendo a aspiração de folículos entre 2 a 8 mm. Este método é utilizado na maioria dos casos para experimentos científicos e controle de qualidade dos sistemas de PIVE em laboratórios (AHUMADA et al., 2013). Outra técnica utilizada para obtenção de ovócitos de animais *post mortem* é o "*Slicing*" ou fatiamento; técnica utilizada para maximização da recuperação de ovócitos a partir de ovários de fêmeas de alto valor genético que vêm a óbito. Para a execução desta técnica a camada cortical do ovário é seccionada em pequenos fragmentos para liberação dos ovócitos (HASLER, 1998).

Para a aspiração folicular transvaginal (Figura1), utiliza-se ultrassom com transdutor conectado a uma guia de aspiração. O transdutor é inserido na vagina da vaca e após localização do ovário por palpação retal, é feito o alinhamento dos folículos na imagem de ultrassom e então iniciada a punção com a penetração da agulha no interior dos folículos ovarianos. É realizada a aspiração do líquido folicular, com auxílio de uma bomba a vácuo, para obtenção dos ovócitos que são direcionados a um tubo coletor (AVELINO, 2002; GALLI, 1996).

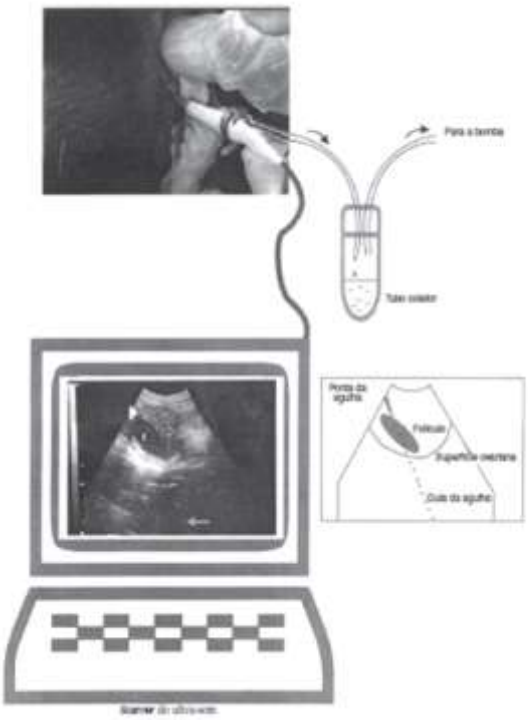


Figura 1. Esquema do procedimento de aspiração folicular via transvaginal guiada por ultrassom em uma vaca. Fonte: HAFEZ et al. 2004.

Os ovócitos aspirados são classificados, após avaliação em microscópio estereoscópico, baseado em critérios quanto ao número de camadas de células do *cumulus oophorus* (COCs) e o aspecto do citoplasma do ovócito (NAGAI, 2001). Define-se complexo cúmulos ovócito (COCs) viáveis os de classificação I a III, sendo os COCs de classe IV designados como inviáveis e posteriormente descartados (STRINGFELLOW; GIVENS, 2010). As características dos quatro tipos de ovócitos são:

Grau I: Ovócitos com *cumulus* compacto e três ou mais camadas de células do *cumulus oophorus*. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom (Figura 2A).

Grau II: Ovócitos com menos de três camadas de células do *cumulus oophorus*. Ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, com possibilidade de estar mais concentradas no centro e mais claras nas bordas ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma ocupa todo espaço interior da zona pelúcida (Figura 2B).

Grau III: Ovócitos que possuem o *cumulus oophorus* presente, mas expandido. Ooplasma contraído, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino, degenerado, vacuolizado ou fragmentado (Figura 2C).

Grau IV: Ovócitos desnudos sem células do *cumulus*, citoplasma com coloração e granulação anormais ou com células expandidas com aspecto apoptótico (Figura 2D).

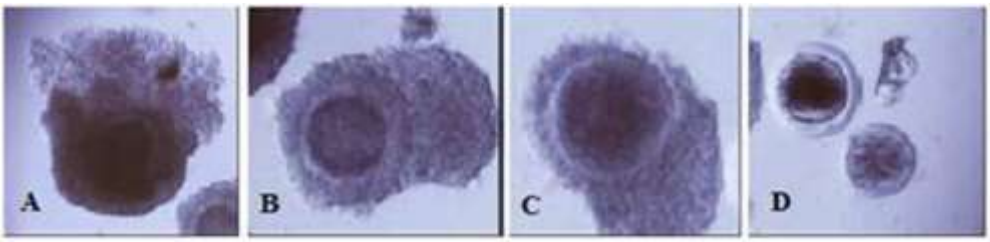


Figura 2. Classificação dos ovócitos segundo a classificação de STRINGFELLOW e GIVENS (2010). A (Grau I), B (Grau II), C (Grau III) e D (Grau IV). Fonte: STRINGFELLOW; GIVENS, 2010.

Aqueles ovócitos selecionados são acondicionados em microtubos e imersos em meio próprio de transporte, então encaminhados até o laboratório por meio de transportador, à temperatura mínima de 34ºC e máxima de 39ºC, para que dê sequência na produção *in vitro* de embriões no laboratório (SANGILD, 2000).

A aspiração folicular não promove danos ao sistema reprodutor da fêmea, visto que quando realizado duas vezes por semana produz resultado mais satisfatório na produção de embriões que quando feita semanalmente ou quinzenalmente (GIBBONS et al., 1994; HASLER et al., 1995; LOONEY et al., 1994; DAYAN, 2001; GARCIA et al., 2004). Pode se assumir

que o folículo dominante é ablado durante cada sessão onde a vaca é submetida a aspiração duas vezes por semana, desta forma estimulando uma onda de pequenos folículos para o crescimento (BERGFELT et al., 1994).

Entretanto, segundo Oliveira et al. (2018), sucessivas punções foliculares em vacas doadoras podem causar lesões macroscópicas nos ovários como cisto, cicatriz lateral e fibrose. Ainda, pode causar fibroma, fibrose, luteoma, ooforites, tecoma e tumor de células da granulosa visto a microscopia óptica. Essas lesões, não só reduzem a fertilidade dessas fêmeas, como podem ainda causar risco à saúde dos indivíduos. Viana et al. (2003) também relataram alterações morfológicas nos ovários, como pontos de perfuração na túnica albugínea, presença de áreas com hemorragia, infiltrados de células inflamatórias e fibrose no estroma ovariano, associado a cicatrizes no trajeto da agulha. Também foram identificados folículos previamente aspirados apresentando hemorragia interna e graus variados de desorganização das camadas da parede folicular.

Para obtenção de bons índices, é necessária uma boa regulagem do sistema de pressão. Altas pressões afetam os ovócitos, provocando perda das células do *cumulus* e ruptura da zona pelúcida. Por outro lado, pressões muito baixas impedem a recuperação e facilitam tanto a aglutinação das estruturas no circuito como a formação de coágulos. A pressão ideal deve ser ajustada a cada sistema e bombas de vácuo que possibilitam a estabilidade da pressão ajustada, sem permitir variações. Usualmente a pressão ideal está entre 60 e 100 mm de mercúrio. No mercado existem diferentes modelos de bombas de vácuo que podem apresentar calibragens distintas na pressão do vácuo, desta forma, a maneira utilizada para ajustar a pressão negativa do aparelho é mensurar em volume de líquido aspirado por minuto. Assim sendo, o recomendado é que a pressão seja entre 10 e 20 mL de líquido aspirado por minuto (HASHIMOTO et al., 1999).

Segundo Cruz et al. (2009) a recuperação de ovócitos de bovinos obtidos por OPU apresenta taxa média de 4,6 ovócitos por sessão em fêmeas *Bos taurus taurus* (Devon) e 16,3 ovócitos *Bos taurus indicus* (Nelore). Júnior (2005) define que a aspiração folicular guiada por ultrassonografia se mostrou eficaz com média de 25,66 ovócitos recuperados por sessão de aspiração.

2.1.2 Maturação *in vitro* (MIV)

A MIV de ovócitos é a técnica responsável por induzir *in vitro* as diversas mudanças citoplasmáticas e nucleares do ovócito, viabilizando desta forma, que o mesmo possa ser

fecundado, originando um blastocisto viável. Durante este processo, o ovócito aspirado em estádio de vesícula germinativa (fase de diplóteno da prófase I da meiose), retoma o reinício da meiose ou maturação nuclear que, *in vivo*, ocorre após o pico pré-ovulatório de LH. Representa o desenvolvimento do estádio de diplóteno da prófase I (meiose I) até fase de metáfase (meiose II) completando a maturação nuclear. A maturação citoplasmática refere-se a modificações ultra estruturais, moleculares e bioquímicas do citoplasma e da membrana plasmática do ovócito, possibilitando o desenvolvimento e o mecanismo enzimático relacionados ao bloqueio da polispermia (Figura 3) (HAFEZ et al., 2004).

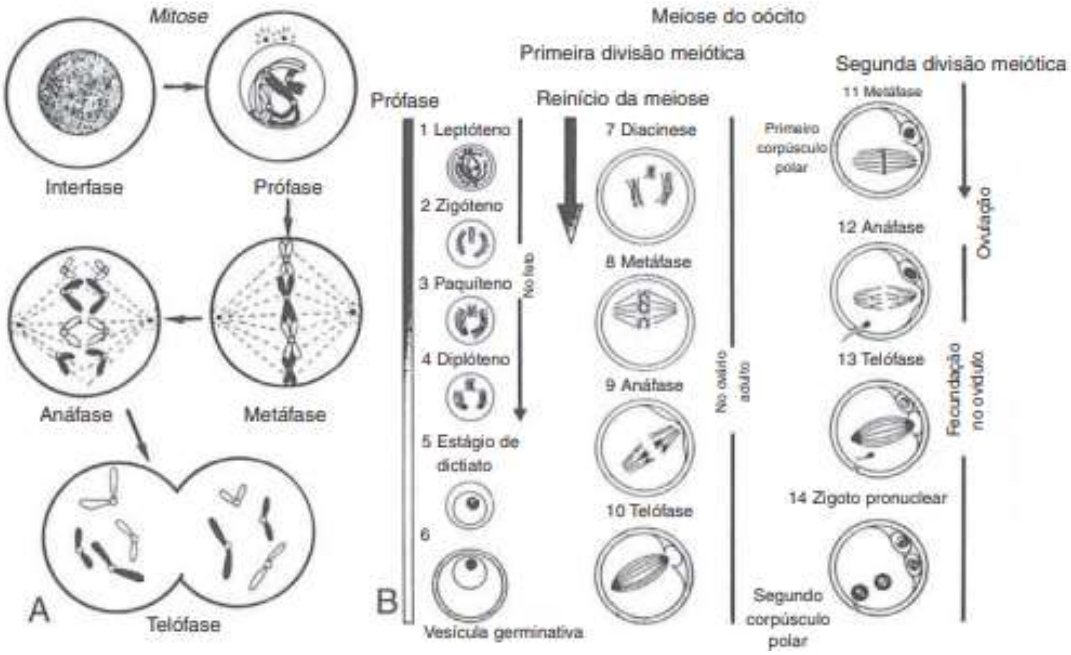


Figura 3. Arranjo dos cromossomos durante a mitose e a meiose. (**A**) Arranjo cromossômico durante a mitose. (**B**) Meiose do ovócito. Fonte: HAFEZ et al., 2004.

Para que o embrião adquira uma boa maturação *in vitro*, é necessário que os meios de maturação promovam uma sincronia da maturação citoplasmática e nuclear (LONERGAN et al., 1994; GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008). Maziero et al. (2016) e Farghaly et al. (2015) estudando as alterações da MIV, e objetivando atingir maior sincronia entre estes acontecimentos, avaliaram dois inibidores da meiose (roscovitina e butirolactona) durante a maturação *in vitro* de ovócitos bovinos e afirmaram que a associação dos dois apresentou maiores taxas de clivagem e de blastocisto do que empregados isoladamente ou na ausência de ambos.

A inovação da ciência voltada à reprodução animal desenvolveu diferentes meios e protocolos utilizados na maturação dos ovócitos *in vitro*: Synthetic Oviductal Fluid - SOF, Ham’s F- 12 e o Tissue Culture Medium 199 (TCM 199®). O mais utilizado nos laboratórios

de reprodução é o TCM199®, adicionado de soro fetal bovino (SFB), aminoácidos como L-glutamina, bicarbonato de sódio, FSH, LH, estradiol-17β, piruvato de sódio, lactato, vitaminas e antibióticos (GANDHI et al., 2000; SMETANINA et al., 2000).

Para concretização da MIV, é necessária uma estufa que conserve atmosfera gasosa e temperatura controlada. Neste equipamento, os ovócitos permanecem por um período que varia de 18 a 24 horas em atmosfera controlada contendo 5% de CO_2 em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008).

2.1.3 Fertilização *in vitro* (FIV)

A fertilização compreende a interação do espermatozoide com o ovócito para obtenção do zigoto que em seguida desenvolve-se até o estádio de blastocisto. Fisiologicamente, este processo corresponde ao momento em que os espermatozoides atingem a ampola da tuba uterina para fecundar o ovócito, após terem sofrido a capacitação espermática (conjunto de alterações bioquímicas) no sistema reprodutor feminino com posterior hiperativação espermática. A partir disto, ocorre a comunicação da membrana do espermatozoide a receptores específicos na zona pelúcida do ovócito, onde ocorre a reação acrossômica (YANG et al., 1993; ASSUMPÇÃO et al., 2002; GONÇALVES et al., 2007).

No processo *in vitro*, para que ocorra o processo de fecundação, os meios e os protocolos utilizados devem fornecer um ambiente adequado, sendo que esse deve permitir o metabolismo dos ovócitos e células do *cumulus*, além de manter a função espermática eficiente para que ocorra a fecundação (YANG et al., 1993; ASSUMPÇÃO et al., 2002; GONÇALVES et al., 2007).

Na presença do meio de fertilização, o espermatozoide capacitado liga-se a receptores presentes na zona pelúcida (ZP3) e então acontece a reação acrossômica, determinada pela fusão das membranas plasmática e acrossomal. Desta forma, o conteúdo acrossômico é liberado, e combinado à motilidade progressiva espermática, contribui com a penetração do espermatozoide e ligação aos receptores ZP2. Após penetrar o espaço perivitelino, a membrana plasmática do espermatozoide une-se à membrana vitelina, acontecendo liberação de cálcio no interior do ovócito. Este influxo de cálcio possibilita a liberação do conteúdo dos grânulos corticais e reação zonal, que determina o enrijecimento da zona pelúcida e impede à poliespermia (VARAGO et al., 2008).

Com a finalidade de promover a FIV, os espermatozoides e ovócitos maduros são co-incubados em meios de fertilização, por aproximadamente 18 horas (DODE; RODOVALHO,

2002). O meio mais empregado na fecundação *in vitro* é o Fert - TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato), que possui agente capaz de proporcionar a capacitação espermática (heparina).

As técnicas mais utilizadas para separação de espermatozoides vivos dos demais componentes do sêmen e dos crioprotetores são o método de migração ascendente (*swinup*) e o gradiente de *Percoll*. A técnica ideal para a separação espermática deve ser rápida, simples, de baixo custo, capaz de recuperar a maioria dois espermatozoides móveis, não resultar em alterações espermáticas, remover espermatozoides mortos e outras células, incluindo microrganismos, remover substâncias tóxicas e bioativas, permitir o processamento de grandes volumes de sêmen, além de permitir o controle de concentração e volume final da suspensão espermática (GONÇALVES et al., 2008).

A técnica de *swimup* consiste na separação de espermatozoides mortos do plasma seminal e demais componentes dos diluidores, através da motilidade ascendente. Esta técnica consiste em depositar 100µL de sêmen no fundo de tubos de centrífuga (15mL) contendo 1 mL de SP-TALP, de modo que o sêmen permaneça no fundo do tubo coberto pelo meio SP-TALP. Na sequência estes tubos devem ser colocados em ambiente a 39º, permitindo que os espermatozoides migrem para a posição superior do meio e os demais constituintes do sêmen permaneçam no fundo do tubo. Posteriormente, o sobrenadante é aspirado de modo que não seja possível que os componentes do sêmen no fundo do tubo entrem em contato com os espermatozoides com motilidade. Posteriormente, esta amostra é transferida para outro tubo para ser centrifugada. Na sequência é coletado o pélete formado no fundo do tubo e então adicionado o volume necessário para obter a concentração final de 1 a 2 x 10^6 espermatozoides/mL (GONÇALVES et al., 2008).

No meio *Percoll* os espermatozoides são selecionados pela passagem por diferentes gradientes, momento que é feita a separação daqueles viáveis do restante dos componentes seminais. A composição do *Percoll* baseia-se em partículas de sílica coloidal cobertas por polivinilpirrolidona, preparado em concentrações distintas para formar um gradiente necessário de separação espermática. Após a maturação dos ovócitos e separação dos espermatozoides viáveis, é obtido um ambiente adequado para que ocorra sua capacitação e a fecundação. Com isso, diversos componentes são adicionados ao meio de fecundação, como a heparina e PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina), pois influenciam na capacitação, incrementam a atividade espermática e aumentam os índices de fecundação (GONÇALVES et al., 2002).

Durante o processo de FIV, para que aconteça a capacitação espermática, é feita a diluição do número necessário de espermatozoides em meio tamponado com bicarbonato

contendo 10 mg/ml de heparina. O meio com o sêmen é distribuído em microgotas sob óleo de parafina ou em poços sem óleo e incubado por 4 horas. Os ovócitos são transferidos para uma placa contendo o meio de maturação (TCM199 com 10% de soro fetal bovino e gonadotrofinas). Posteriormente, quatro a cinco ou um grupo de CCOs são colocados em microgotas do mesmo meio sob óleo de parafina em placas de Petri e então incubados a 39 °C em 5% de CO_2 e 95% de ar com alta umidade por 24 horas (HAFEZ et al., 2004).

2.1.4 Cultivo ou co-cultivo *in vitro* (CIV)

Após a FIV, os zigotos devem ser cultivados para posterior desenvolvimento antes de serem transferidos para o útero ou criopreservados. O CIV refere-se a técnica que possibilita o desenvolvimento embrionário *in vitro*, correspondente ao período de desenvolvimento embrionário pré-implantação, marcado por importantes eventos, como clivagem, ativação do genoma embrionário, compactação dos blastômeros, diferenciação do trofoblasto e embrioblasto, formação e expansão da blastocele e rompimento da zona pelúcida (LONERGAN et al., 1999).

Para isso, são utilizados meios específicos como o *Whitten* e o *BrinsterMedium for OvumCulture* (BMOC), acrescidos da utilização do co-cultivo de embriões com outros tipos celulares, como células epiteliais do oviduto bovino (CEOB), células da granulosa, vesículas trofoblásticas, células VERO (linhagens celulares estabelecidas para cultivo), células BRL *(buffaloratliver)*, células endometriais, ou do cultivo em meio condicionado por vários outros tipos celulares (GONÇALVES et al., 2007; BUENO; BELTRAN, 2008).

Esta etapa é executada durante um período entre 7 a 9 dias, dependendo do objetivo da rotina de PIV, em temperatura de 39ºC com atmosfera controlada (5% de O2, 5% de CO2 e 90% de N2) e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008). Durante o processo, o zigoto passa por várias divisões celulares ou clivagens até se constituir em blastocisto, estádio adequado para execução da transferência de embrião. Deve ser realizado monitoramento da cinética de desenvolvimento embrionário para obtenção de embriões de bons índices qualitativos e quantitativos na etapa de cultivo *in vitro* (BLONDIN; SIRARD, 1995; MINAMI, 1996; BREVINI-GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; CAMARGO et al., 2001).

Por fim, os embriões produzidos a partir da FIV devem ser classificados baseados em seus aspectos morfológicos. Conforme definido por HAFEZ et al. (2004), a classificação deve ser realizada do seguinte modo (Figura 3): Mórula: Blastômeros individuais não-distintos, espaço perivitelino ocupado pelo embrião; Mórula Compacta: Blastômeros individuais tornam-

se mais próximos, formando uma massa embrionária compacta que ocupa dois terços do espaço perivitelino; Blastocisto Inicial: Embrião com a cavidade preenchida com fluido ou blastocele, ocupando três quartos de espaço perivitelinico, trofoblasto e MCI podem ser diferenciadas; Blastocisto: Pronunciada diferenciação do trofoblasto externo, MCI compacta e mais escura, blastocisto muito proeminente e embrião ocupando quase todo o espaço perivitelinico; Blastocisto expandido: o embrião cresce notadamente em tamanho, a zona pelúcida torna-se mais fina; Blastocisto em Eclosão: o embrião no processo de eclosão, zona pelúcida desprendida; e Blastocisto Eclodido: o embrião reexpandido com blastocisto grande, circular, muito frágil e em estágios mais avançados, alongados.

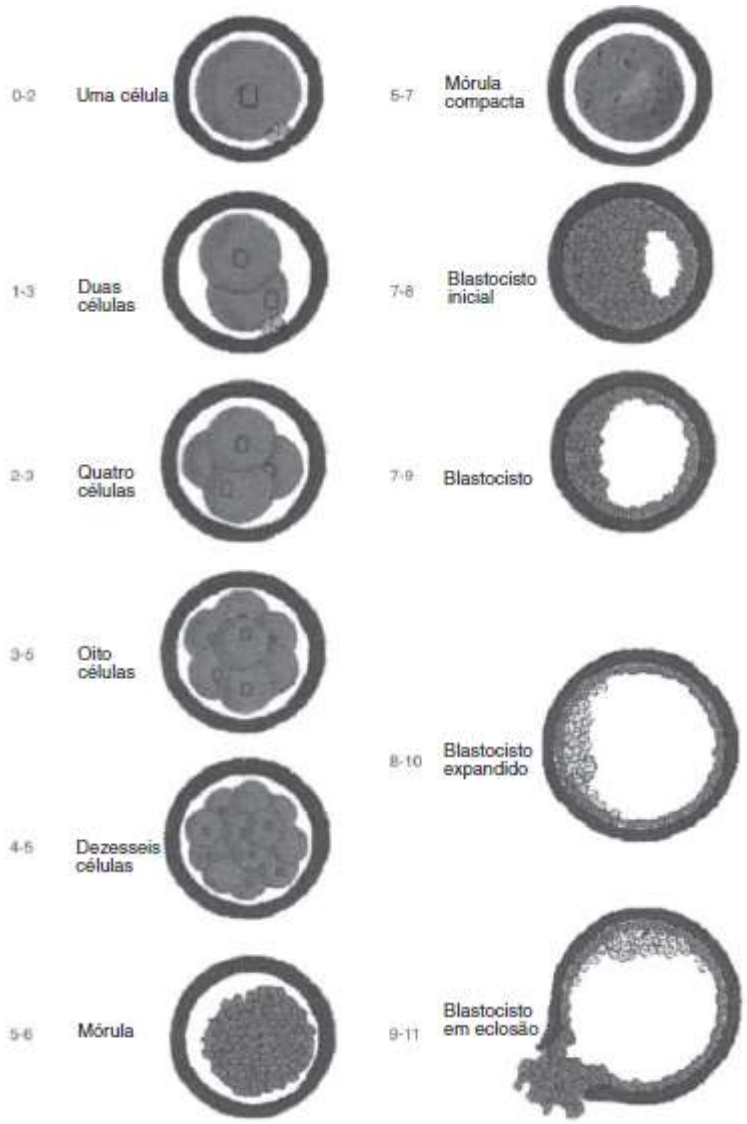


Figura 4. Classificação inicial do desenvolvimento de embriões bovinos. Fonte: HAFEZ et al. 2004.

De acordo com a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), os embriões bovinos produzidos também podem ser classificados quanto à qualidade. Desta forma, podem ser usados os seguintes códigos: 1 (qualidade excelente): embriões sem defeitos morfológicos ou extrusões celulares, estágio de desenvolvimento compatível com período pós-ovulação; 2 (qualidade regular) embriões com maior número de alterações morfológicas ou extrusões celulares, mas com pelo menos 50% da massa celular íntegra e mostrando sinais de desenvolvimento, 3 (qualidade pobre) embriões com extrusões celulares ou fragmentação comprometendo mais que 50% da massa celular e dificultando a classificação das células viáveis, potencial de desenvolvimento significativamente reduzido; 4 (mortos ou degenerados) embriões com comprometimento definitivo da massa celular, com blastômeros de tamanhos variados apresentando sinais de degeneração celular, picnose, fragmentação e alterações de cor (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998).

2.2 Fatores que interferem negativamente na PIV

Embora seja uma biotecnologia que proporciona inúmeras vantagens ao pecuarista, esta gera alto custo e deve ser bem monitorada para maximizar seu aproveitamento, desta forma é importante controlar a sazonalidade, parâmetros nutricionais do rebanho, qualidade do sêmen empregado e senescência das doadoras.

Os índices de gestação resultante da transferência de embriões PIV depende de diversos fatores, estes relacionados à fêmea, raça, nutrição, método e local de transferência ou da interação entre esses fatores. Adicionalmente, falhas no reconhecimento materno da gestação são apontadas como as principais responsáveis por perdas embrionárias (LEITE et al., 2019).

2.2.1 Fatores relacionados às fêmeas

Taxas de fertilização e clivagem reduzem com o avançar da idade de fêmeas bovinas (MALHI et al., 2008; FERREIRA, 2011; SU et al., 2012) e já está descrita uma queda da eficiência reprodutiva determinada por mudanças no perfil hormonal e que podem ser detectadas por alterações na dinâmica folicular ovariana (VOM SAAL et al., 1994). Trabalhos descrevem que há um menor número de embriões e uma maior proporção de ovócitos não-fertilizados e zigotos degenerados após superestimulação ovariana a partir de fêmeas mais velhas em comparação com as mais jovens, havendo produção inferior a 50% dos embriões em consideração ao total de ovócitos recuperados por doadora mais velhas quando comparadas as

doadoras mais novas. No entanto, apesar da diferença dos resultados do aproveitamento de ovócitos em embriões, a sobrevivência de embriões após transferidos para as receptoras jovens é igual quando comparadas as origens do embrião (doadoras velhas com as jovens), demonstrado que não há diferença entre as perdas embrionárias ou gestacionais entre as doadoras jovens e velhas (MALHI et al., 2008).

Estudos voltados a entender a senescência reprodutiva bovina e sua interferência na PIV apontam que há relação direta entre ovócitos de baixa qualidade com animais mais velhos (DAYAN, 2001; PEIXOTO et al., 2006; MALHI et al., 2008). Trabalhos feitos por MERMILLOD et al. (1992), com o objetivo de verificar os efeitos da idade na produção de blastocistos após a maturação, fertilização e cultivo embrionário *in vitro*, apontaram que fêmeas entre 1 e 3 anos produzem maior número de embriões quando comparadas a fêmeas mais velhas. Em contrapartida, outros estudos indicam que fêmeas mais velhas produzem menor número de ovócitos e com baixa porcentagem de desenvolvimento, também apresentam baixa qualidade devido ao menor número de camadas de células do *cumulus*, formando ovócitos menos competentes (GARCIA et al., 1999; SU et al., 2012)

Há uma variabilidade muito grande entre as doadoras, onde não só a idade da doadora pode interferir nos índices de aproveitamento da PIVE, mais também a fase do ciclo estral que esta doadora se encontra, como é demonstrado em trabalhos que o desenvolvimento folicular influencia a competência ovocitária, uma vez que o diâmetro do folículo afeta diretamente o ovócito (MACHATKOVA, et al., 2004).

PEIXOTO et al. (2004) observaram que melhores taxas de prenhez acontecem em receptoras que deram cio um dia antes da aspiração folicular, ou um dia antes do cio da doadora. Conforme CALLESEN et al. (1996), isto é explicado pelo estabelecimento das condições uterinas ideais mais cedo. Deve acontecer uma conexão entre o ambiente uterino e o embrião para maximizar a sobrevivência embrionária, já é conhecida a importância da progesterona por controlar mudanças no útero, além de influenciar o crescimento embrionário (REIS et al., 2006). Porém, CAROLAN et al. (1996), SENEDA et al. (2001), não observaram influência do diâmetro folicular sobre a competência do ovócito, analisando ovócitos aspirados de folículos pequenos e grandes. WATANABE *et al*. (1998) indicam que doadoras distintas apresentam resultados variáveis tanto na produção de ovócitos quanto na qualidade dos mesmos, como na clivagem e no desenvolvimento embrionário até o estádio de blastocisto.

O ciclo estral das fêmeas possui fases distintas, desta forma para os animais que vão passar pela OPU, é interessante que se encontrem na fase luteínica, assim o ovário vai possuir folículos de vários tamanhos, e em diversas fases de crescimento, o que não acontece

exatamente em animais na fase folicular, onde os ovários, na presença de um folículo grande ou dominante, os demais folículos já estão em processo de atresia (REIS et al., 2006).

Outros autores relatam não haver efeito da presença do corpo lúteo no ovário das fêmeas submetidas a PIVE no momento da aspiração sobre a qualidade ovocitária. Sales et al. (2018) avaliando a presença do corpo lúteo, relataram que este não influenciou na qualidade de ovócitos imaturos, do ponto de vista nuclear e morfológico. De forma semelhante, Guemra et al. (2013) apontaram que a presença do corpo lúteo não influenciou a qualidade morfológica.

2.2.2 Fatores relacionados a raça

Existe diferença entre produção média de ovócitos dentre as doadoras em relação a sua aptidão e origem. Segundo Looneyet al. (1994), são observados resultados superiores em vacas de corte. De Armas et al. (1994) concluíram que vacas holandesas produziram média de 6,8 ovócitos por OPU, enquanto vacas zebuínas produziram 5,1. Dominguez (1995) constataram que vacas de origem européia apresentaram maior quantidade de folículos grandes (≥10mm) e que, quanto maior o folículo, pior a qualidade dos ovócitos obtidos.

No entanto, SALES et al. (2018), registraram que vacas *Bos indicus* apresentaram produção total de ovócitos superior, em ovócitos viáveis, e ainda melhor índice de qualidade dos ovócitos, quando comparadas a vacas *Bos taurus,* o que deve explicar também, a maior taxa de clivagem dos gametas observada nesses animais.

2.2.3 Fatores relacionados a nutrição

O balanço energético, bem como a nutrição possui relação direta com o desempenho reprodutivo dos animais, isto significa que o animal que possui alguma deficiência nutricional terá piores taxas de concepção (BEDERE et al., 2018). Desta forma é necessário acompanhar o escore de condição corporal (ECC), objetivando obter valores entre 3 e 4 numa escala de 1 a 5 (TORRES et al., 2015; FERREIRA et al., 2013).

O uso de antioxidantes na dieta das doadoras pode trazer benefícios na reprodução animal. Foi descrito que o selênio, quando adicionado a dieta de vacas em programa de PIVE possibilita a obtenção de maior quantidade de ovócitos totais aspirados, viáveis, embriões e blastocistos expandidos, melhorando assim quantitativa e qualitativamente os resultados (MORAES et al., 2012).

2.2.4 Fatores relacionados ao método

Fatores relacionados aos técnicos responsáveis pelo procedimento de aspiração folicular, podem expressar variações no número de folículos aspirados, bem como no número de ovócitos recuperados na FIV. Também há registro de variações de índices entre sessões diferentes de um mesmo técnico veterinário com grupos repetidos de animais (NIBART et al., 1995). Além disto, o material utilizado no procedimento pode alterar a eficiência da recuperação de ovócitos, devendo-se atribuir importância a aspectos como a espessura da agulha, fio de corte do bisel e pressão de vácuo (BROGLIATTI & ADAMS, 1996). LANSBERGEN *et al*. (1995) indicam que a maior variação ocorre devido a doadora e, o segundo fator mais importante é o operador.

2.2.5 Aspectos relacionados ao clima

Particularidades climáticas de cada região podem interferir nos índices reprodutivos dos rebanhos inseridos nas mesmas, portanto, umidade relativa do ar, pluviometria, tipo de solo e cobertura forrageira são aspectos importantes que devem ser levados em consideração, pois estes, em certas situações, podem limitar a eficiência produtiva e reprodutiva, com impactos diretos na PIVE (PEIXOTO et al., 2006; FERREIRA, 2011; DOURADO et al., 2012).

Considerando que grande parte do rebanho bovino brasileiro é alimentado a pasto, alterações climáticas ao decorrer do ano além de interferir no bem-estar animal, interferem também na qualidade e disponibilidade de alimento para estes animais (FERREIRA, 2011). Com o objetivo de mensurar os efeitos das alterações climáticas no decorrer do ano, TRIBULO et al. (1991) verificaram que vacas da raça *Brahman* mantidas a pasto produziram maior número de estruturas totais e fecundadas em coletas realizadas nos meses do verão (época chuvosa) quando comparadas com aquelas realizadas nos meses do inverno (época seca), sendo observado, nesta estação do ano, menor número de ovócitos viáveis e embriões por coleta. Com o objetivo de entender o efeito da sazonalidade na reprodução de bovinos, RUBIN et al. (2005), trabalhando com doadoras da raça Nelore, relataram que as fêmeas produziram maior proporção de ovócitos viáveis na época da primavera e verão quando comparado com a época do outono e inverno.

Em estudos realizados por SOUZA et al. (2007), com doadoras da raça Nelore, submetidas a bom manejo nutricional, foi observado baixo efeito da época do ano na coleta de

embriões viáveis, sendo que as médias encontradas foram 11,0 e 9,8 para o verão e inverno, respectivamente.

Em trabalhos avaliando com fêmeas *Bos taurus* (Holandesas) e *Bos indicus* (Brahman) submetidas a aspiração folicular durante a primavera/verão e outono/inverno, foi relatado que as fêmeas Holandesas apresentaram menor porcentagem de ovócitos normais durante os meses da primavera e verão (24,5%) em relação aos meses do outono e inverno (80,0%) e ainda uma menor porcentagem de ovócitos fertilizados que atingiram o estágio de 8 células, sendo que nenhum embrião chegou ao estádio de mórula ou blastocisto. Já para as fêmeas da raça Brahman, não foi visto diferença na porcentagem de ovócitos normais ou no desenvolvimento embrionário entre as estações do ano, por fim foi concluído que a alta temperatura e umidade ambiental durante o período do verão resultaram em declínio na qualidade embrionária a partir de ovócitos obtidos de fêmeas da raça Holandesa, não se observando o mesmo efeito na raça Brahman, talvez pelo fato das mesmas serem mais resistentes aos danos provocados pelo aumento da temperatura ambiental (ROCHA et al., 1998).

Conforme descrito na literatura, o estresse calórico também afeta as propriedades estruturais, físicas e bioquímicas das membranas celulares, atribuindo diferenças na morfologia dos ovócitos coletados no inverno em relação ao verão e, ainda, um maior teor de ácidos graxos saturados no verão e poli-insaturados no inverno (ZERON et al., 2001). Na mesma linha de pesquisa, segundo SARTORI et al. (2002), o alimento na temperatura corporal, comumente observados durante o verão, provoca hipertermia e interfere com a produção de calor endógeno, tendo consequências negativas na função reprodutiva, reduzindo assim, as taxas de fertilização e de desenvolvimento embrionário. Tal fato se relaciona a possível prejuízo da capacidade esteroidogênica dos folículos e da dinâmica folicular ovariana, afetando-os no início do estádio antral de desenvolvimento e causando prejuízo no folículo subsequente, na função e na redução da dominância do folículo selecionado (GUZELOGLU et al., 2001; Al KATANANI et al., 2002; JU et al., 2005; CAMARGO et al., 2007).

2.2.6 Aspectos relacionados ao sêmen

Na bovinocultura de leite é desejado obter maior número de fêmeas conforme o interesse produtivo, desta forma em muitos casos utiliza-se sêmen sexado, permitindo a seleção de fêmeas para maior potencial de produção de leite (MOCÉ et al., 2006; RATH & JOHNSON, 2008; SILVA et al., 2015). Porém o processo de sexagem pode danificar características estruturais do espermatozoide bovino, mas não impede a geração de embriões *in vitro* (LU &

SEIDEL, 2004; GARNER & SEIDEL, 2008; CARVALHO et al., 2010; ARRUDA et al., 2012). Estudos com sêmen sexado apontam baixas taxas de clivagem e blastocisto, enquanto outros não tem observado diferenças no desenvolvimento de blastocistos entre o sêmen sexado e não-sexado (LU & SEIDEL, 2004; CARVALHO et al., 2010; STINSHOFF et al., 2012).

Tais diferenças podem acontecer devido a vários fatores, como os métodos de seleção dos ovócitos, qualidade do sêmen sexado ou tipo de cultivo. Por outro lado, diferenças individuais dentre os touros foram observadas, mostrando que o sêmen de alguns touros pode ser mais negativamente afetado pelo processo de sexagem do que outros touros (LU & SEIDEL, 2004; BLONDIN et al., 2009; ARRUDA et al., 2012; SILVA, 2012; TRIGAL et al., 2012), como também já foi observado variações partidas de sêmen de touros (SAUVÉ, 1998). Desta forma é indispensável a execução de testes para avaliar cada partida de sêmen.

Conforme descrito no processo de fertilização *in vitr*o da PIVE, há a adição de heparina ao meio de fertilização para proporcionar a capacitação espermática, contudo estudos indicam que há variações individuais entre touros quanto a concentração de heparina para causar a capacitação espermática, como foi observado por GONSALVES et al. (2008), que verificaram variação de 2 a 100 µg/mL de heparina em meio, dependendo do touro e do processo de separação espermática.

LU & SEIDEL (2004) relatam que, em média, 10 µg/mL de heparina em meio, é eficiente nos diferentes processos e para os diferentes touros. Segundo os autores, ao avaliar sêmen sexado de diferentes touros, observa-se que diferentes concentrações de heparina são necessárias para se obter uma boa capacitação. O sêmen sexado de alguns touros não necessitava da heparina como um reagente para se induzir à capacitação, apontando que as concentrações espermáticas efetivas do mesmo touro podem diferir entre o sêmen sexado e não-sexado.

Por outro lado, fatores associados com o processo de sexagem, em alguns casos, podem proporcionar parcialmente a capacitação espermática, gerando diferenças nas taxas de blastocisto entre touros individuais (PALMA et al., 2008; SILVA, 2012). MELLO et al. (2016) apontam que doadoras fertilizadas com sêmen não-sexado apresentam melhores taxas de clivagem e de blastocistos, favorecendo o programa de produção *in vitro*.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de embrioes *in vitro* é uma biotecnologia que auxilia o pecuarista a produzir maior número de animais geneticamente superiores aos seu progenitores. Entretanto, embora

traga muitas vantagens, possui diversos fatores que podem influenciar os resultados esperados, desta forma deve ser bem implantada na propriedade para obtenção de resultados satisfatórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AL-KATANANI, Y.M.; PAULA-LOPES, F.F.; HANSEN, P.J. Effect of time and exposure to heat stress on the competence of oocytes in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.390-396, 2002.

ANDRADE, G. A.; FERNANDES, M. A.; KNYCHALA, R. M.; PEREIRA JÚNIOR, M. V.; OLIVEIRA, A. J.; NUNES, D. P.; BONATO, G. L.; SANTOS, R. M. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Rev Bras Reprod Anim**, v.36, p.66-69, 2012.

ARMSTRONG, D. T. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**. v. 93, p. 7-24, 1993.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; LEMES, K.M.; SILVA, D.F.; RODRIGUEZ, S.A.F.; AFFONSO, J.F. Aspects related to the technique and the utilization of sexed semen *in vivo* and *in vitro.* **Animal Reproduction**, v.9, n.3, p.345- 353, 2012.

ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; HAIPECK, K.; LIMA, A. L.; MELLO, M. R. B.; OLIVEIRA, L. J.; OLIVEIRA, V. P.; TAVARES, L. M. T.; VISINTIN, J. A. Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.39, p.149-156, 2002.

AVELINO, K.B., VANTINI, E., SENEDA, M.M., et aI. *In vitro* production of embryos of cows with acquired infertility. **Theriogenology,** v.57, p.656, 2002.

BEDERE, N.; CUTULLIC, E.; DELABY, L.; GARCIA-LAUNAY, F.; DISENHAUS, C. Meta-analysis of the relationships between reproduction, milk yield and body condition score in dairy cows. **Livestock Science,** v. 210, p. 73-84, 2018. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez372.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1871141318300246 ?via%3Dihub>. Acesso em 20 de julho de 2019.

BERGFELT, D. R.; LIGHTFOOT, K. C.; ADAMS, G. P.; Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in cyclic heifers.**Theriogenology** 1994.

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

BLONDIN, P.; BEAULIEU, M.; FOURNIER, V.; MORIN, N.; CRAWFORD, L.; MADAN, P.; KING, W.A. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology,** v.71, p.30-38, 2009.

BOLS, P. E. J.; LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; SOOM, A. V.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.

BRACKETT, R. G.; ZUELKE, K. A. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology,** v.39, p.43-64, 1993.

BREVINI-GANDOLFI, T. A. L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology,** v.55, p.1255-1276, 2001.

BROGLIATTI, G.M., ADAMS, G.P., Ultrasound guided transvaginal oocyte collection in prepupertal calves. **Theriogenology**, v.45, p.1163, 1996.

BUENO, A. P.; BELTRAN, M. P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Ver Elet Med Vet**, n.11, p.1-7, 2008.

CAMARGO, L. S. A.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; VIANA, J. H. M. Efeito de sistema de cultivo, célula somática e soro em co-cultura sobre o desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*. **Arq Bras Med Vet Zoo**, v.53, 2001.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; RAMOS, A.A. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. **Theriogenology**, v.68, p.626-632, 2007.

CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; MACHADO, G.M.; MOURÃO, G.B.; DODE, M.A.N. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v.74, p.1521-1530, 2010.

CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MONGET, P.; MONNIAUX, D.; MERMILLOD, P. Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 43, p. 477-483,1996.

CALLESEN, H.; LIBORIUSSEN, T.; GREVE, T. Pratical aspects of multiple ovulation-embryo transfer in cattle.**Anim Reprod Sci**, v.42, p.205-214, 1996.

CRUZ, F. B.; MARTINS, L. T.; MARINHO, L. S. R.; FARELL, F.; VIEIRA, A. D.; MAZZAALIRA, A. Aspiração folicular m vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* e vitrificação dos oócitos em condições de campo. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages v. 8, p. 184-187, 2009.

DAYAN, A. **Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação *in vitro*.** 2001. 56f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2001.

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

DESCÔTEAUX, L.; GNEMMI, G.; COLLOTON, G. Principles and recommendations in ultrasound imaging. In: **Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography.** p. 23-25, ed 1. Editora Willey Blackwell, USA, 2010.

DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C.; UENO, V. G.; FERNANDES, C. E.The effect of sperm preparation and time of co-incubation on *in vitro* fertilization of *Bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 69, n.1-2, p. 15-23, 2002.

DOMINGUEZ, M.M. Effect of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. **Theriogenology**, v.43, p.1405-1408, 1995.

DOURADO, A.P.; TORRES FILHO, R.A.; CARDOSO, E.C.; SINEDINO, L.D.P.; GERHARDT, B.T.; GOULARD, I.L.; NOGUEIRA, L.A.G. Produção estacional de embriões *in vivo* em vacas da raça Gir (*Bos indicus*) na região sudeste (clima tropical), Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.19, n.3, p.183-189, 2012.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, **FAOSTAT.**2012. Disponível em: http://faostat3.fao.org/ Acesso em 18 de fevereiro de 2019.

FARGHALY, T.; KHALIFA, E.; MOSTAFA, S.; HUSSEIN, M.; BEDAIWY, M.; AHMADY, A. The effect of temporary meiotic attenuation on the *in vitro* maturation outcome of bovine oocytes.***In Vitro* Cel lDev Biol Anim**, v.51, p.662-71, 2015.

FERREIRA, M.B.D. **Obtenção de oócitos e produção *in vitro* de embriões em doadoras lactantes da raça Gir (*Bos taurus indicus*).** Jaboticabal: 2011. 176f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2011.

FERREIRA, M. C. N.; MIRANDA, R.; FIGUEIREDE, M. A.; COSTA, O. M.; PALHANO, H. B. Impacto da condição corporal sobre a taxa de prenhez de vacas da raça nelore sob regime de pasto em programa de inseminação artifcial em tempo fxo (iatf). **Ciências Agrárias.** Londrina, v. 34, n. 4, p. 1861-1868, 2013. Disponível em:<http://www.redalyc.org/html/4457/445744122032/>.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects 01IVM-IVF in cattle.**Anim. Reprod. Sci.**, v.42, p.371-379, 1996.

GANDHI, A. P.; LANE, M.; GARDNER, D. K.; KRISHER, R. L. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Human Reprod**, v.15, p.395-401, 2000.

GARCIA, J. M.; ESPER, C. R.; AVELINO, K. B.; PUELKER, R. Z.; VANTINI, R., ALMEIDA Jr., I.; RODRIGUES, C. F. M. Desempenho e limitações na produção *in vitro* de

embriões bovino de vacas com infertilidade adquirida. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS,** v.27, n.1, p.237, 1999.

GARCIA, J. M.; AVELINO, K. B.; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. In: I **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina, PR. Anais… SIRAA: Londrina, 2004, p.223-230.

GIBBONS, J. R.; BEAL, W. E.; KRISHER, R. L.; FABER, E. G.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, v.42, p.405419, 1994.

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

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. B.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Ver Bras Reprod Anim**, v.31, p.212-217, 2007.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. Ed. São Paulo: Roca, 2008, 395p.

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

GUEMRA, S.; MONZANII, P.S.; SANTOS, E.S.; ZANINI, R.; OHASHIII, O.M.; MIRANDAII, M.S.; ADONAI, P.R. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.65, n.6, p.1616-1624, 2013.

GUZELOGLU, A.; AMBROSE, J.D.; KASSA, T.; DIAZ, T.; THATCHER, M.J.; THATCHER, W.W. Long-term follicular dynamics and biochemical characteristics of dominant follicles in dairy cows subjected to acute heat stress. **Animal Reproduction Science,** v.66, p.15-34, 2001.

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

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.

HASLER, J. F.; HENDERSON, W. B.; HURTGEN, P. J.; JIN, Z. Q.; MCCAULY, A. D.; MOWER, S. A.; NEELY, B.; SHUEY, L. S.; STOKES, J. E.; TRIMMER, S. A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v.43, p.151-152, 1995.

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.

JU, J.C.; JIANG, S.; TSENG, J.K.; PARKS, J.E.; YANG, X. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.64, p.1677-1689, 2005.

JÚNIOR, I. N. PRODUÇÃO DE EMBRIÕES EM VACAS NELORE (*Bos taurus indicus)* COM A ASSOCIAÇÃO DOS MÉTODOS *IN VIVO* E IN VITRO. Dissertação (Mestrado em Saúde animal) – Universidade Estadual de Londrina. 2005.

LANSBERGEN, L.M.T.E., VAN W. LEEUW A.M., DAAS, J.H.G., RUIG, L., VAN DER STREEK, G., REINDERS, J.M.C., AARTS, M., RODEWIJK, J. Factors affecting ovum pick-up in cattle.,**Theriogenology,** v.43 p.259, 1995.

LEITE, A. C.; GRAZIA, J. G. V.; SOLLECITO, N. V.; ANDRADE. V. B.; MARTINS, T. M.; BORGES, A. M. Biotecnicas reprodutivas: faça a escolha certa. **Revista Leite Integral.** Disponivel em: http://www.revistaleiteintegral.com.br/noticia/biotecnias-reprodutivas-faca-a-scolha-certa.Acessoem 18 de fevereiro de 2019.

LOONEY, C.R., LINDSEY, B.R., GONSETH, C.L., JOHNSON, D. L., Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows., **Theriogenology** v.41 p.73, 1994.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M. P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Mol Reprod Devel** v.37, p.48-53, 1994.

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

LOONEY, C. R.; LINDSEY, B. R.; GONSETH, C. L.; JOHNSON, D. L. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. **Theriogenology**, v.41 p.62-72, 1994.

LU, K.H.; SEIDEL Jr., G.E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. **Theriogenology**, v.62, p.818-830, 2004.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. **Theriogenology,** v. 61, p. 229-335, 2004.

MALHI, P.S.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFF, R.J.; SINGH, J. Superovulatory response in a bovine model of reproductive aging. **Animal Reproduction Science**, v.109, p.100-109, 2008.

MAZIERO. R.; GUAITOLINI, C.; PASCHOAL, D. M.; KIEVITSBOSCH, T.; GUASTALI, M. D.; MORAES, C. N.; LANDIM-ALVARENGA, F. Effect of Temporary Meiotic Attenuation of Oocytes with Butyrolactone I and Roscovitine in Resistance to Bovine Embryos on Vitrification. **Reprod Domest Anim**, v.51, p.204-11, 2016.

MELLO, R. R. C.; MELLO, M. R. B.; SOUSA, S. L. G.; FERREIRA, J. E. Parâmetros da produção de embriões da raça Sindi. **Pesquis aagropecuária brasileira**, Brasília, v.51, n.10, p.1773-1779. 2016.

MERMILLOD, P.; WILS, C.; MASSIP, A.; DESSY, F. Collection of oocytes and production of blastocysts *in vitro* from individual, slaughtered cows. Journal of **Reproduction and Fertility**, v.96, p.717-723, 1992.

MINAMI, N. Early embryonic development under oviductal influence *in vitro*. **Anim Reprod Sci,** v.42, p.361-369, 1996.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K.; SCHENK, J.L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. **Theriogenology,** v.66, p.929-936, 2006.

MORAES, G. V. **Avaliação quali-quantitativa da transferência de embriões em bovinos**. 1990. p. 170, Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jabuticabal.

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

NEIVA, R. Genômica promove seleção mais veloz. **Embrapa, 2018.** Disponível em: https://www.embrapa.br/xxi-ciencia-para-a-vida/busca-de-noticias/-/noticia/21256939/genomica-promove-selecao-mais-veloz.

NIBART, M.; SILVA PEIXER, M.; THUARD, J.M.; DURANT, M.; GUYADER-JOLY, C.; PONCHON, S.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLOT, P. Embryo production by OPU and IVF in dairy cattle. In: Réunion A.E.T.E., XI, Hannover, **Proceedings**, p.216, 1995.

NOTÍCIAS AGRÍCOLAS. **IBGE: Com 34, milhões de litros, produção de leite é a segunda maior desde 1974.** Goiânia, 2020. Disponível em: https://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/leite/271289-ibge-com-348-bilhoes-de-litros-producao-de-leite-e-a-segunda-maior-desde-1974.html#.X5a6WtJKjIV. Acesso em: 26 out. 2020.

OLIVEIRA, C. E.; MUSSE, G.; COELHO, H. E.; ALBERTO, H.; NOLASCO, R. M.; BARBOSA, C. H. G.; REZENDE, L. C.; CARVALHO, T. F.; LOPES, L. F.; LOPES, M. C. Alterações macroscópicas e histopatológicas ovarianas em vacas doadoras zebuínas. **Pubvet**. v. 12 No. 04 p. 147, 2018.

PALMA, G.A.; OLIVIER, N.S.; NEUMÜLLER, C.H.; SINOWATZ, F. Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of *in vitro* fertilization and ultrastructure of *in vitro* produced bovine blastocysts. Anatomy, **Histology, Embryology**, v.37, p.67-73, 2008.

REIS, A. R.; METELO, P.; SANTOS, F.; SILVA, M. Efeito da estrutura ovárica e da idade de bovinos da raça HolsteinFriesian na quantidade e qualidade de ovócitos e de embriões produzidos *in vitro*. Braz J Vet Res AnimSci. v.43, n.5, 2006. Disponível em: http://www.revistasusp.sibi.usp.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962006000500007&lng=pt&nrm=iso. Acesso em 18 de fevereiro de 2019.

PEIXOTO, M.G.C.D.; BERGMANN, J.A.G.; FONSECA, C.G.; PENNA, V.M; PEREIRA, C.S. Effect of environmental factor son multipleovulation of zebu donors. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p.567-574, 2006.

PEIXOTO, M. G. C. D.; BERGMANN, J. A. G.; ALVIM, M. T. T.; PENNA, V. M. **Fatores que influenciaram a prenhez de embriões zebuínos em receptoras mestiças**. In: Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal. Pirassununga, SP: SBMA, 2004.

PENNA, V. M. Núcleo MOET em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. n. 4, p.84104, 1993.

RATH, D.; JOHNSON, L.A. Application and commercialization of flow cytometricallysexsorted semen. **Reproduction in DomesticAnimals**, v.43, p.338-346, 2008.

RENESTO, A. **Associação das biotécnicas: Aspiração folicular guiadapor ultrassonografia e superovulação na produção in vito e *in vivo* de embriões bovinos.** Tese (Doutorado). Arquivos da faculdade de Ciência Agrárias UNESP. p. 17-31, 2004.

RUBIN, K.C.P.; MAX, M.C.; PONTES, J.H.F. Influência da estação do ano na produção de oócitos em vacas da raça Nelore. **Acta Science Veterinariae**, v.33, p.372, 2005. (Resumo).

ROCHA, A.; RANDEL, R.D.; BROUSSARD, J.R.; LIM, J.M.; BLAIR, R.M.; ROUSSEL, J.D.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in Bostaurus but not in Bosindicus cows. **Theriogenology**, v.49, p.657-665, 1998.

RUBIN, K.C.P.; MAX, M.C.; PONTES, J.H.F. Influência da estação do ano na produção de oócitos em vacas da raça Nelore. **Acta Science Veterinariae**, v.33, p.372, 2005. (Resumo).

SALES, J. N. S.; IOGUMA, L. T.; BATISTA, R. I. T. P; QUINTÃO, C. C. R; GAMA, M. A. S.; et al. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **Journalof Dairy Science,** v. 98, n.5, p. 3086-3099, 2018. Disponível em: <https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(15)00137-X/fulltext>. doi: 10.3168/jds.2014-8858.

MORAES, G. V.; AZEVEDO, J. R.; CARNEIRO, T. C.; CAVALIERI, F. L. B.; MATAVELI, M.; et al. Oocyte aspiration and in vitro embryo production in Jersey cows with selenium-supplemented diet. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 64, n. 3, p. 787-795, 2012. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352012000400001>.

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

SANTL, B.; WENIGERKIND, H.; SCHERVNTHANER, W.; MÖDL, J.; STOJKOVIC, M.; PRELLE, K.; HOLTZ, W.; BREM, G.; WOLF, E. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in Simmental heifers. **Theriogenology**, v.50, p.89-100, 1998.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S.A. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2803-2812, 2002.

SAUVÉ, R. Ultrasound guided follicular aspiration and *in vitro* fertilization. **Arq. Fac. Vet. UFRGS,** v.26, n.1, p.141-155, 1998.

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

SILVA, A.P.T.B. **Efeito da raça da doadora e do touro (Holandesa e Gir) na produção *in vitro* de embriões bovinos.** Seropédica: 2012. 33p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, 2012.

SILVA, A.P.T.B.; MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; MELLO, M.R.B. 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, n.1, p.51-58, 2015.

SMETANINA, I. G.; TATARINOVA, L. V.; KRIVOKHARDCHENNKO, A. S. 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.

SOUZA, J.A.T.; MACEDO, N.A.; CARTER, J.A. Eficiência de doadoras e receptoras de embriões segundo a época do ano, a categoria e genótipo das receptoras. **Acta Science Veterinariae**, v.35, p.1235, 2007. (Resumo).

STINSHOFF, H.; KRIENKE, M.; EKHLASI-HUNDRIESERA, M.; WILKENING, S.; HANSTEDT, A.; FRESE, D.; RATH, D.; BOLLWEIN, H.; WRENZYCKI, C. Seminal plasma and seminal plasma proteins added to bulk sorted sperm do not alter the mRNA expression of *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology,** v.78, p.132-139, 2012.

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D.**Manual of the International Embryo Transfer Society.** Illinois: International Embryo Transfer Society, 2010.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. Manual da So-ciedade Internacional de Transferência de Embriões. **IETS**, p. 112-113, Illinois, 1998

SU, L.; YANG, S.; HE. X.; LI, X.; MA, J.; WANG, Y.; PRESICCE, G.A.; JI, W. Effect of donor age on the developmental competence of bovine oocytes retrieved by ovum pick up. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.184-189, 2012.

TAKAHASHI, T.; SASAKI, K.; SOMFAI, T.; NAGAI, T.; MANABE, N.; EDASHIGE, K. N. N-Dimethylglycine decreases oxidative stress and improves *in vitro* development of bovine embryos. **J Reprod Dev**, v.62, p. 209-12, 2016.

TRIBULO, H.; BO, G.A.; JOFRE, F. Effect of LH concentration in a porcine pituitary extract and season on superovulatory response of Bosindicusheifers. **Theriogenology**, v.35, p.286, 1991.

TRIGAL, B.; GOMEZ, E.; CAAMANO, J.N.; MUNOZ, M.; MORENO, J.; CARROCERA, S.; MARTIN, D.; DIEZ, D. *In vitro* and *in vivo* quality of bovine embryos *in vitro* produced with sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v.78, p.1465-1475, 2012.

TORRES, H. A. L.; TINEO, J. S. A.; RAIDAN, F. S. S. Influência do escore de condição corporal na probabilidade de prenhez em bovinos de corte. **Arquivos de Zootecnia,** v. 64, n. 247, p. 255-260, 2015. Disponível em:<http://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/view/403/382>.

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. **Ver Bras Reprod Anim**, v.32, p.100-109, 2008.

VIANA, J. H. M.; NASCIMENTO, A. A.; PINHEIRO, N. L.; FERREIRA, A. M.; CAMARGO, L. S. A.; SÁ, W. F. & JÚNIOR. Caracterização de sequelas subsequentes à punção folicular em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 23, 119-124, 2003.

VOM SAAL, F.S.; FINCH, C.E.; NELSON, J.M. **Natural history and mechanisms of reproductive aging in humans, laboratory rodents, and other selected vertebrates.** In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. The Fisiology of Reproduction.2.ed. New York: Raven Press, v.2, p.1213-1214, 1994.

WATANABE, Y.F.; WATANABE, M.R.; DAYAN, A.; VILA, R.A.; LÔBO, R.B. Competência de oócitos, oriundos de diferentes fêmeas bovinas, na produção *in vitro* de blastocistos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS,** v.26, n.1, p.384-385, 1998.

YANG, X.; JIANG, S.; FOOTE, R. H. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. **Mol Reprod Devel**, v.34, p.94-100, 1993.

ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. **Reproduction**, v.121, p.447-454, 2001.

ZULLO, G.; ALBERO, G.; NEGLIA, G.; DE CANDITIIS, C.; BIFULCO, G.; CAMPANILE, G.; GASPARRINI, B. L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine *in vitro*-produced embryos. **Theriogenology**, v.85, p.668-97, 2016.