



Progresso metodológico e sua influência na produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil

Influence of methodology progress on in vitro production of bovine embryo in Brazil

J.M.P. Lima¹, F.A. Santos, M.M.L. Pimentel, M.B. Bezerra

Laboratório de Transplantes Gonadais e Produção *In Vitro* de Embriões, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

¹Correspondência: mrsjoelminha@hotmail.com

Resumo

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos apresenta significativa expressão nacional em níveis comercial e científico, sendo responsável pela produção de aproximadamente 250 mil embriões ao ano. Obteve seus primeiros produtos em 1977 no Japão e em 1982 nos Estados Unidos, ao passo que o primeiro bezerro brasileiro foi produzido anos mais tarde, em 1994. A partir daí, como uma técnica consolidada, vem apresentando estudos para o melhoramento de sua metodologia acerca de diversos temas, como maturação oócitária, capacitação espermática, aditivos para os meios de cultura, entre outros. Esta revisão teve como objetivo elencar os avanços nas metodologias que marcaram a história contribuindo para o aumento da eficiência nas taxas de bovinos produzidos *in vitro* no Brasil. Adicionalmente, serão abordados aspectos históricos necessários para o desenvolvimento da produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil e aspectos atuais que ainda se apresentam como um empecilho na elevação da eficiência dessa biotécnica. Mesmo sendo uma técnica bem estabelecida e amplamente utilizada, ainda é perceptível a necessidade de avanços em determinadas etapas, principalmente em relação à maturação.

Palavras-chave: bovinos, embriões, metodologia, produção *in vitro*.

Abstract

The first products resulting from the in vitro production of bovine embryos (IVP) were obtained in 1977 in Japan, 1982 in the United States of America and some years later in Brazil (1994). Since these events the technique has been seen as successful it is importance to the science and industry. Nowadays the Brazilian production of in vitro products is about 250,000 embryos per year. Although widely used, this biotechnology needs to be updated constantly to ensure more efficiency in its stages. Thus, the purposes of this review are to list in chronological order the advances which have marked the history, contributing to increasing the efficiency of IVP in Brazil and current aspects that still stand as an obstacle to improve this technique.

Keywords: bovines, embryos, in vitro production, methodology.

Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica aplicada à reprodução animal destinada a diversos fins, entre eles o melhoramento genético, a preservação da saúde animal, a observação de eventos biológicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário inicial e o aumento da eficiência produtiva de rebanhos (Gottardi e Mingoti, 2009). Essa biotécnica compreende etapas de coleta, maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), cultivo *in vitro* (CIV; Pessoa et al., 2010) e transferência embrionária (TE; Gottardi e Mingoti, 2009), processos esses que vêm sendo utilizados desde 1990 no Brasil (Oliveira et al., 1994) como uma ferramenta para a multiplicação de animais de alto valor genético, na clonagem e na produção de animais transgênicos, mostrando-se, assim, de forma importante na área científica (Rumpf, 2007), bem como na indústria (Galli et al., 2003).

Os processos de produção *in vitro* de embriões são comercialmente apresentados como uma metodologia de sucesso desde 1978, quando Steptoe e Edwards relataram o nascimento do primeiro ser humano a partir do uso dessa biotécnica (Steptoe e Edwards, 1978).

Em 1982, Brackett et al. relataram o primeiro nascimento de um bezerro obtido nos EUA pela técnica, disseminando, assim, a utilização e estimulando o aperfeiçoamento de equipamentos e de metodologias que, desde então, vêm sendo empregadas com perspectivas promissoras (Boone e Shapiro, 1990), uma vez que viabilizaram nascimento de expressivo número de produtos (Galli e Lazzari, 1996).

Até o final da década de 90, a PIVE no Brasil era uma atividade basicamente restrita a laboratórios de pesquisa e, portanto, sem expressão comercial (Galli et al., 2003). Por ser um processo tecnicamente complexo e com elevado custo de implantação, estimava-se que a produção de embriões em laboratório seria utilizada de



forma restrita, ocupando apenas nichos específicos de mercado. Entretanto, em um período de apenas cinco anos, o país tornou-se o maior produtor mundial e referência no uso de PIVE em bovinos. O sucesso comercial da técnica no Brasil foi decorrente de uma conjunção de fatores, que foram desde a estabilização econômica, passando pela rentabilidade do setor agropecuário, até o investimento em pesquisas nos últimos anos, sendo esses investimentos consequência de dois aspectos: a grande adaptabilidade do rebanho (80% composto por raças zebuínas – *Bos indicus*) ao ambiente existente no Brasil e o abastecimento do mercado interno por produtos oriundos de bovinos: carne e leite, o que tornou o Brasil o país com o maior número de cabeças de gado atualmente (Rumpf, 2007; Pontes et al., 2011; Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes - ABIEC, 2014).

O entendimento das particularidades genéticas (Hansen, 2004) e fisiológicas (função, desenvolvimento e metabolismo de gametas e embriões), bem como da utilização de hormônios (Brackett e Zuelke, 1993) e de fatores de crescimento específicos nos meios de cultivo (Mochizuki et al., 1991) proporcionaram grandes avanços nas etapas da produção *in vitro* de embriões em mamíferos (Chaves et al., 2010). Dessa forma, vários estudos foram e continuam sendo realizados com o objetivo de incrementar as etapas dessa biotécnica visando à sua máxima eficiência.

O objetivo desta revisão foi elencar, em ordem cronológica, os avanços nas metodologias que contribuíram para o aumento da eficiência nas taxas de bovinos produzidos *in vitro* no Brasil, tendo como ponto inicial o nascimento do primeiro bezerro produzido *in vitro*. Além disso, visou abordar aspectos históricos necessários para o desenvolvimento da produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil e aspectos atuais que ainda se apresentam como um empecilho na elevação da eficiência dessa biotécnica.

Décadas de 1970-80

Em julho de 1978, a produção *in vitro* de embriões tornou-se uma técnica de grande visibilidade mundial, quando, na Inglaterra, nasceu o primeiro ser humano produzido *in vitro* (Steptoe e Edwards, 1978). Porém, foram necessários anos de pesquisas em diferentes áreas da biotecnologia para a realização de todo o procedimento de maneira eficaz. Durante as décadas de 1970 e 1980, pesquisas relacionadas à maturação oocitária (Xu et al., 1988; Sanbuissho e Threlfall, 1989) nuclear (Jagiello et al., 1974) e citoplasmática (Cran, 1989) foram realizadas com o objetivo de esclarecer aspectos que são determinantes para o nascimento de produtos viáveis. Algumas dessas pesquisas tinham como objetivo determinar as mudanças ocorridas com o oócito durante a maturação *in vitro*, porém só puderam ser observados aspectos em nível nuclear (Jagiello et al., 1974). Durante a década de 1970, houve o nascimento do primeiro bezerro produzido por meio de duas etapas seguidas da PIVE (maturação e fertilização *in vitro*) que ocorreu no Japão no ano de 1977; o relato do acontecimento, contudo, só foi feito anos mais tarde (1986) por Hanada et al. Outros fatos que marcaram o sucesso da PIVE nessa década foram o desenvolvimento do fluido sintético de oviduto (SOF; Tervit et al., 1972), um meio de produção que simula as condições fisiológicas do organismo feminino e, assim, auxilia no desenvolvimento embrionário (Vieira, 2006); o meio Tyrode-albumina-lactato-piruvato (TALP), utilizado na etapa de FIV (Bavister e Yanagimachi, 1977), e fatores para a capacitação espermática mediante o uso de cálcio (Singh et al., 1978).

Nos anos 80, foram publicados trabalhos acerca dos aspectos que determinam o êxito ou o fracasso da PIVE: maturação citoplasmática (Cran, 1989), maturação nuclear (Kubelba et al., 1988), importância das células da granulosa e do *cumulus oophorus* durante a obtenção de competência oocitária na maturação *in vitro* (Staigmiller e Moor, 1984), tempo de maturação nuclear de oócitos, determinando o tempo de maturação *in vitro* para o máximo de 24 h (Sirard et al., 1989), alguns aspectos sobre a reação acrossômica sofrida pelo espermatozoide durante a fertilização (Flormam e First, 1988; Sidhu e Guraya, 1989), uso de células somáticas no cocultivo de embriões (Gandolfi e Moor, 1987) e produção de embriões bovinos *in vitro* com o uso de heparina na capacitação espermática (processo no qual ocorrem mudanças bioquímicas na membrana plasmática do espermatozoide), como uma metodologia eficiente (Leibfried-Rutledge et al., 1989). Apesar de muitos trabalhos terem sido publicados após a metade da década, foi ainda em 1982 que houve o primeiro relato do nascimento de um bezerro produzido por fertilização *in vitro* (Brackett et al., 1982), o que não se caracterizou totalmente como um produto da PIVE, pois os oócitos utilizados foram maturados *in vivo*.

Década de 1990

Os anos de 1990 foram muito importantes para a comunidade científica brasileira, pois foi a partir desse período que as pesquisas sobre a PIVE tiveram início no Brasil. Durante toda a década, a assim chamada FIV era tema exclusivo de pesquisadores de instituições de pesquisa e ensino, conseqüentemente não havia qualquer expressão comercial (Siqueira et al., 2012). Mediante o início das pesquisas nacionais, houve a necessidade de se estabelecerem parâmetros (anatômicos, fisiológicos e metabólicos) dos animais nativos para a utilização das metodologias mais adequadas (Oliveira et al., 1994).

Em 1990, foram estabelecidos parâmetros de controle de qualidade para os laboratórios onde eram



realizadas fertilizações *in vitro* e cultivo de embriões. Nessa época, determinou-se que muitos materiais feitos da borracha apresentavam toxicidade às células manipuladas, causando um prejuízo na produtividade final do laboratório. Outros aspectos também foram estudados, como qualidade da água, que deveria ser ultrapura ou passar por processos de filtrações sucessivas para garantir bons índices de produção de embriões; composição dos gases utilizados nos processos de maturação, fertilização e cultivo: dióxido de carbono (CO₂), oxigênio (O₂) e nitrogênio (N₂), os quais devem estar a 5%, 5% e 90%, respectivamente; temperatura da incubadora, que deve se encontrar em torno dos 37°C, pois se aproxima da temperatura normal do animal, não causando um choque térmico no material biológico; concentração de íons de hidrogênio para a espécie bovina, para os quais deve ser mantido um pH entre 7 e 8 e incidência de luz, que deve ser baixa, pois foi comprovado o efeito deletério sobre alguns estágios do desenvolvimento celular. O estabelecimento de tais fatores proporcionou aumento da exigência de materiais e equipe treinada. Este estudo determinou que vários aspectos são críticos nos resultados das etapas da PIVE e que outros aspectos ainda não profundamente estudados também comprometeriam as taxas de produção, como a detecção de infecções. Porém, deve-se obedecer a procedimentos padrões de controle de qualidade pelos laboratórios para garantir que as taxas *in vitro* sejam cada vez mais semelhantes às *in vivo* (Boone e Shapiro, 1990).

Após quatro anos, a equipe do Laboratório de Reprodução Animal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) obteve o primeiro produto brasileiro totalmente *in vitro* (Dode e Rumpf, 2002). Ainda nesse mesmo ano, pesquisadores da Universidade Estadual Paulista publicaram um trabalho que demonstrava a necessidade de uma metodologia específica a ser aplicada para a produção de embriões bovinos provenientes das espécies *Bos indicus* (raça Nelore). Esse estudo evidenciou que os espermatozoides dessa raça tinham a necessidade de maior quantidade de heparina para sua capacitação e necessitavam de maior concentração para a fertilização dos oócitos; também percebeu que os ovários das fêmeas eram menores e apresentavam menos folículos quando comparadas às espécies *Bos taurus* (Oliveira et al., 1994). Durante a década de 1990, grande parte do material biológico das pesquisas realizadas com oócitos bovinos no Brasil era proveniente de abatedouro, entretanto, em 1995, a Embrapa anunciou no Brasil o uso de uma técnica consolidada em 1988 por pesquisadores holandeses (Boni, 2012) utilizada para a obtenção de oócitos: a punção folicular por via transvaginal guiada por ultrassom (OPU) realizada com o animal ainda vivo, a qual apresentava vantagens quanto ao número de bezerras que podem ser produzidos por meio de uma doadora, pois a punção pode ser realizada várias vezes no mesmo animal, porém tal técnica apresentou desvantagens quanto ao tempo entre as repetições das aspirações, pois a cicatrização do tecido exige um tempo mínimo (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, 2004).

No final dessa década (1998), o experimento de Vajta et al. demonstrou a possibilidade da utilização do processo de vitrificação de embriões e oócitos, o que causou um grande impacto na PIVE, pois a partir daí seria possível o armazenamento de material biológico por um período prolongado.

Durante toda essa década foi possível observar que a preocupação com estabelecimento de padrões que visaram à melhoria dos índices da PIVE ajudou a impulsionar a pesquisa. Um desses fatores foi o estabelecimento da temperatura ótima de incubação *in vitro* entre 38,5 e 39°C (Boone e Shapiro, 1990; Thompson, 1996).

Década de 2000

Essa década é iniciada com pesquisas relacionadas ao uso de oócito de bezerras de três meses e o nascimento de crias fruto da fertilização desses oócitos. Além disso, a PIVE se estabelece como viabilizador para técnicas como: clonagem por transferência nuclear, injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e transgenia (Dode e Rumpf, 2002).

A partir de 2001, a PIVE apresentou-se de forma acentuada, contribuindo para o aumento do rebanho bovino nacional, e, em um período de cinco anos, o Brasil tornou-se o maior produtor mundial e referência no uso de PIVE em bovinos. O êxito comercial da técnica no país foi decorrente de fatores de mercado, eficiência intrínseca à produção de embriões, desenvolvimento de tecnologias associadas e o investimento em pesquisas nos últimos anos. Após mais de uma década de uso comercial da PIVE, é possível analisar seu impacto no mercado de embriões no Brasil. A avaliação da atividade da PIVE nos últimos 12 anos permite identificar períodos distintos quanto ao comportamento do mercado em relação ao uso da técnica. Até o ano de 2000, a produção *in vivo* de embriões, única tecnologia de embriões disponível em escala comercial, mostrava tendência de alta, apesar de flutuações ocasionais. Essa tendência se manteve mesmo nos primeiros anos (2000-2003) após o início da atividade dos primeiros laboratórios de PIVE comerciais. Nos anos posteriores (2004-2006), a PIVE contornou parte das limitações de outras técnicas reprodutivas e propiciou aumento significativo na atividade, por meio da migração de empresas que utilizavam outras técnicas reprodutivas, tornando-se a técnica mais utilizada nos animais das espécies *Bos indicus* (Hansen, 2004; Viana e Camargo, 2007; Siqueira et al., 2012) o que elevou ainda mais o número de embriões produzidos (Viana et al., 2010). Entre os anos de 2006 e 2008, houve uma diminuição do uso da PIVE por parte do mercado de gado de corte (Siqueira et al., 2012), contudo, nesse mesmo período, observou-se aumento da utilização da técnica pelos produtores de gado leiteiro,



totalizando mais de 15% do rebanho produzido *in vitro* (Viana et al., 2010).

Em relação às contribuições científicas trazidas nesse período, foi possível observar a produção de diversas revisões de literatura sobre temas relacionados às técnicas envolvidas com a reprodução de bovinos, e a partir daí se começa a perceber a eleição pela PIVE, por ser a técnica mais moderna e com amplo espectro de utilização (Rumpf, 2007; Varago et al., 2008).

Um aspecto importante para o avanço das pesquisas relacionadas à PIVE foi a consolidação da proteômica como uma ciência em 1995, que visa caracterizar um conjunto de proteínas expressas em um determinado momento (Di Ciero e Bellato, 2002). Esse fato impulsionou abordagens com uma visão mais molecular sobre aspectos da maturação oocitária, esclarecendo várias questões e dúvidas antigas sobre o assunto (Meinecke et al., 2001; Bhojwani et al., 2006). No estudo de Cordeiro et al., em 2001, foi observado que, nas células do *cumulus*, durante o período de maturação, ocorre mudança no padrão de síntese proteica, sendo algumas proteínas estágio-específicas.

Década de 2010

Até o ano de 2010, o Brasil possuía o maior mercado produtor de carne bovina, o maior rebanho do mundo e uma grande quantidade de embriões produzidos, ultrapassando o valor de 250.000 ao ano (Siqueira et al., 2012), o que representava mais de 50% da produção mundial (Neves et al., 2010; Silveira et al., 2012). Com a apresentação de dados elevados de produção de produtos, passou-se a considerar que esses índices poderiam não estar ligados exclusivamente ao conhecimento científico que se tinha até o momento, mas sim a questões nutricionais, climáticas e mercadológicas (Neves et al., 2010).

Não apenas o gado de corte é de interesse comercial para o Brasil, mas também o gado leiteiro, que vem aumentando o número de cabeças em seu rebanho por meio do uso da PIVE (Viana et al., 2010); com isso, é preciso se obterem dados científicos que comprovem o melhor método e as melhores raças a serem utilizadas para tal fim. Oliveira et al. (2013) comprovaram que, em locais de clima tropical, o uso de oócitos de vacas GIR leiteiras é mais eficiente no sistema de PIVE.

Atualmente, ainda é possível observar publicações sobre aspectos a serem melhorados para elevação das taxas de produtos obtidos *in vitro*: influências de hormônios no desenvolvimento da competência oocitária (Rosa, 2011), estudo de técnicas de vitrificação (Carvalho et al., 2012) e punção folicular (Seneda e Blaschi, 2012), tempo entre aspiração do foliculo e início dos processos realizados *in vitro* (Loiola, 2013) e estresse térmico sobre os animais (Oliveira et al., 2013).

Considerações finais

A PIVE surgiu como uma técnica reprodutiva auxiliar ao melhoramento animal e consolidou-se no país, sendo atualmente usada em larga escala. O progresso ocorrido nos últimos 40 anos vem causando um notável impacto no setor econômico brasileiro, e isso demonstra que o uso de uma biotécnica não depende apenas de sua eficiência, mas também de fatores econômicos do mercado que a utiliza e da propulsão que ela gera, auxiliando o avanço de outras tecnologias.

Atualmente as metodologias utilizadas pelos laboratórios que realizam a PIVE estão bem estabelecidas, porém ainda são necessários estudos em partes das técnicas que envolvam uso de substâncias, equipamentos e estudos de caráter molecular, para que a sua eficácia apresente-se em constante elevação.

Referências

- Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC).** Rebanho bovino brasileiro. Disponível em: http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp. Acesso em: 15 ago. 2014
- Bavister BD, Yanagimachi R.** The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro. *Biol Reprod*, v.16, p.228-237, 1977.
- Bhojwani M, Rudolph E, Kanitz W, Zuehlke H, Schneider F, Tomek W.** Molecular analysis of maturation processes by protein and phosphoprotein profiling during in vitro maturation of bovine oocytes: a proteomic approach. *Cloning Stem Cells*, v.8, p.259-274, 2006.
- Boni R.** Punção folicular em bovinos: uma análise retrospectiva de 25 anos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 26, 2012, Foz do Iguaçu, PR. Anais... Foz do Iguaçu: SBTE, 2012. p.255-261.
- Boone WR, Shapiro SS.** Quality control in the in vitro fertilization laboratory. *Theriogenology*, v.33, p.23-50, 1990.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA.** Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod*, v.27, p.147-158, 1982.
- Brackett BG, Zuelke KA.** Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, v.39, p.43-64, 1993.



- Carvalho AA, Faustino LR, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Costa APR.** Vitriificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. *Acta Vet Bras*, v.5, p.236-248, 2012.
- Chaves RN, Duarte ABG, Matos MHT, Figueiredo JR.** Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.34, p.37-49, 2010.
- Cran DG.** Cortical granules during oocyte maturation and fertilization. *J Reprod Fertil Suppl*, n.38, p.49-62, 1989.
- Di Ciero L, Bellato CM.** Proteoma: avanços recentes em técnicas de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa. *Biotechnol Ciênc Des*, n.29, p.158-164, 2002.
- Dode MAN, Rumpf R.** Produção *in vitro* de embriões – eficiência, limitações e perspectivas futuras: visão da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. In: Anais do *workshop* sobre embriões bovinos produzidos *in vitro*: perspectivas de utilização e possíveis impactos na pecuária brasileira. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 2002. p.11-31. (Documentos, 88).
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.** Fecundação *in vitro* gera bezerros de qualidade. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/1996/setembro/bn.2004-11-25.7352342028>. Acesso em: 2 mar. 2014.
- Florman HM, First NL.** The regulation of acrosomal exocytosis 1: sperm capacitation is required for the induction of acrosome reaction by the bovine zona pellucida *in vitro*. *Dev Biol*, v.128, 453-463, 1988.
- Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lazzari G.** Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, v.59, p.599-616, 2003.
- Galli C, Lazzari G.** Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.371-379, 1996.
- Gandolfi F, Moor RM.** Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil*, v. 81, p.23-28, 1987.
- Gottardi FP, Mingoti GZ.** Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. *Rev Bras Reprod Anim*, v.33, p.82-94, 2009.
- Hanada A, Enya Y, Suzuki T.** Birth of calves by non-surgical transfer of *in vitro* fertilized embryos obtained from oocytes matured *in vitro*. *Jpn J Anim Reprod*, v.32, p.1208, 1986.
- Hansen PJ.** Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim Reprod Sci*, v.82/83, p.349-360, 2004.
- Jagiello GM, Miller WA, Ducayen MB, Lin JS.** Chiasma frequency and disjunctional behavior of ewe and cow oocytes matured *in vitro*. *Biol Reprod*, v.10, p.354-363, 1974.
- Kubelba M, Motlik J, Fulka JrJ, Prochazka R, Rimkevichova Z, Fulka J.** Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamide block. *Gamete Res*, v.19, p.423-431, 1988.
- Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Parrish JJ, First NL.** *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.31, p.61-74, 1989.
- Loiola MVG.** Validação de um programa de produção *in vitro* de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. 2013. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, 2013.
- Meinecke B, Janas U, Podhajsky E, Meinecke-Tillmann S.** Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. *Reprod Domest Anim*, v.36, p.183-188, 2001.
- Mochizuki H, Fukui Y, Ono H.** Effect of the number of granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.36, p.973-986, 1991.
- Neves JP, Miranda KL, Tortorella RD.** Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. *Rev Bras Zootec*, v.39, n. esp, p.414-421, 2010.
- Oliveira EB, Watanabe YF, Garcia JM.** Establishment of an IVF program for zebu cattle (*Bos indicus*) in Brazil. *Theriogenology*, v.41, p.188, 1994. Resumo.
- Oliveira EC, Delgado RC, Rosa SR, Sousa PJOP, Neves LO.** Efeitos do estresse térmico sobre a produção de bovinos de leite no município de Marilândia, ES. *Enciclopédia Biosfera*, v.9, n.16, p.913-9, 2013.
- Pessoa GA, Navarro RB, Rauber LP, Brass KE, Silva CAM, Rubin MIB.** Influence of climatic conditions on *in vitro* production of bovine embryos. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.62, p.1381-1387, 2010.
- Pontes JHF, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KCP, Seneda MM.** Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donos. *Theriogenology*, v.75, p.1640-1646, 2011.
- Rosa PRA.** Proteínas ligantes dos receptores de fatores de crescimento em complexo cumulus-oócito bovino. 2011. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia da Reprodução) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2011.
- Rumpf R.** Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. *Rev Bras Zootec*, v.36, p.229-233, 2007.
- Sanbuisso A, Threlfall WR.** The effects of estrous cow serum on the *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. *Theriogenology*, v.31, p.693-699, 1989.
- Seneda MM, Blaschi W.** Ovum pick up em bovinos: considerações técnicas. In: Simpósio Internacional de



Reprodução Aplicada, 1, 2012, Cornélio Procópio, PR. Cornélio Procópio, PR: GeraEmbryo, 2012. p.231-237. Disponível em: <http://www.geraembryo.com.br/artigos/1o-simpósio-internacional-de-reproducao-animal-aplicada>.

Sidhu KS, Guraya SS. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Int Rev Cytol*, v.118, p.231-280, 1989.

Silveira CO, Penitente Filho JM, Costa SL, Silveira RO, Silvas TF, Vivacqua D. Considerações sobre a produção *in vitro* de embriões. In: Simpósio Brasileiro de Agropecuária Sustentável, 4, Congresso Internacional de Agropecuária Sustentável, 1, 2012, Porto Alegre, RS. Anais... Porto Alegre: Simpósio/UFRGS, 2012. p.666-669.

Singh JP, Babcock DF, Lardy HA. Increased calcium-ion influx is a component of capacitation of spermatozoa. *Biochem J*, v.172, p.549-56, 1978.

Siqueira LGB, Fonseca JF, Camargo LSA, Viana JHM. Factores que afectan a la fecundación *in vitro* em bovinos. *Spermova*, v.2, p.10-12, 2012.

Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod*, v.40, p.1257-1263, 1989.

Staigmiller RB, Moor RM. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res*, v.9, p.221-229, 1984.

Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, v.312, p.366, 1978.

Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*, v.30, p.493-497, 1972.

Thompson JG. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology* v.45, p.27-40, 1996

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*, v.51, p.53-58, 1998.

Varago FC, Mendonça LF, Lagares MA. 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.

Viana JHM, Camargo LSA. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. *Acta Sci Vet*, v.35, p.915-924, 2007.

Viana JHM, Siqueira LGB, Palhão MP, Camargo LSA. Evolução no uso das técnicas de fertilização *in vitro* na última década e impacto na indústria de embriões bovinos e produção animal no Brasil. *Acta Sci Vet*, v.38, supl.2, p.323-334, 2010.

Vieira AD. Criopreservação de ovócitos imaturos e embriões bovinos produzidos *in vitro*. 2006. 72f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2006.

Xu KP, Hoier T, Greve T. Dynamic changes of estradiol and progesterone concentrations during *in vitro* oocyte maturation in cattle. *Theriogenology*, v.30, p.245-255, 1988.