



EVENTOS FISIOLÓGICOS E ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS - REVISÃO

PHYSIOLOGICAL EVENTS AND DEVELOPMENTAL STAGES IN THE *IN VITRO* PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS - REVIEW

Dayana Silva Araújo

Rafael Monteiro dos Santos

RESUMO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de carne bovina, o que torna necessário o uso de biotécnicas da reprodução para a maior propagação deste produto em volume e qualidade de produto ofertado. Dentre as biotécnicas reprodutivas aplicadas a campo, a produção *in vitro* de embrião se apresenta como importante ferramenta para a aceleração do melhoramento genético. As etapas de produção *in vitro* de embrião (PIVE) são: obtenção de oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), cultivo de embriões *in vitro* (CIV) e transferência de embriões. Entender os processos fisiológicos que ocorrem *in vivo*, desde a ovulação, passando pela fertilização até a formação completa do blastocisto é imprescindível para buscar a mimetização *in vitro* o mais adequada possível para um desenvolvimento embrionário bem sucedido. Assim sendo, esta revisão buscou relatar a importância do conhecimento dos eventos fisiológicos *in vivo* e dos processos que envolvem a produção *in vitro* de embriões.

PALAVRAS-CHAVE: Aspiração folicular; Fertilização; Maturação; Cultivo embrionário.

ABSTRACT

Brazil is the world's largest producer and exporter of beef, which makes the use of reproductive biotechnologies essential for increasing both the volume and quality of the product offered. Among the reproductive biotechnologies applied in the field, *in vitro* embryo production stands out as an important tool for accelerating genetic improvement. The stages of *in vitro* embryo production (IVP) are: oocyte retrieval, *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF), *in vitro* embryo culture (IVC), and embryo transfer. Understanding the physiological processes that occur *in vivo*, from ovulation through fertilization to the complete formation of the blastocyst, is essential to mimic *in vitro* conditions as closely as

possible for successful embryo development. Therefore, this review aimed to highlight the importance of understanding *in vivo* physiological events and the processes involved in *in vitro* embryo production.

KEYWORDS: Follicular aspiration; Fertilization; Maturation; Embryo culture

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é detentor do maior rebanho comercial bovino do mundo, com 202 milhões de animais, o que representa 12,2% do rebanho mundial. O país também é o segundo maior produtor de carne, enquanto os Estados Unidos da América é o primeiro. Porém, quanto ao crescimento da produção desta *commodity*, o Brasil lidera o ranking com a produção de 1,70 milhões de toneladas. Além disso, foi responsável por 27,7% das exportações mundiais e por 20,0% da carne consumida no mundo em 2022. Neste mesmo ano, as áreas de pastagens diminuíram em 5,70%, o que implicou na necessidade do país de se tornar mais produtivo, com maior número de animais produzidos em menor área (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES, 2023). Desse modo, para este objetivo, a multiplicação mais eficiente de animais de maior mérito genético, seja por meio da inseminação artificial ou da transferência de embriões produzidos *in vitro* ou *in vivo* é essencial.

A produção de embriões bovinos *in vitro* representa uma área de pesquisa importante para a pecuária atual, oferecendo oportunidades de melhorar a produtividade e a qualidade genética do rebanho. Desde as primeiras descobertas brasileiras da produção *in vitro* de embriões (PIVE) em 1980, a biotécnica vem sendo aperfeiçoada permitindo criar protocolos mais eficientes quanto ao desenvolvimento do embrião *in vitro* (Baruselli et al., 2019a). A técnica é difundida não apenas em bovinos, mas também em pequenos ruminantes (Souza-Fabjan et al., 2014), em equinos (Hinrichs, 2010) e suínos (Gil et al., 2010). Entretanto, dentre as espécies citadas, a espécie bovina é a que apresenta maior destaque quanto a sua produção e comercialização (Gonçalves e Viana, 2019).

As etapas da PIVE consistem na obtenção dos gametas (oócitos) e sua posterior maturação *in vitro* (MIV) (Guemra et al., 2013), fertilização *in vitro* (FIV) (Parrish, 2014) e,

por fim, cultivo *in vitro* (CIV) (Takahashi et al., 2002). Após a última etapa os embriões estão aptos a serem transferidos para receptoras sincronizadas ou criopreservados.

Assim os objetivos desta revisão de literatura é descrever os eventos fisiológicos e detalhar as etapas relacionadas com a produção *in vitro* de embriões bovinos, informando os eventos necessários para mimetizar ambiente adequado para o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

2. ASPECTOS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

2.1. Produção de embriões bovinos no Brasil

A produção de embriões bovinos é um processo de reprodução assistida que permite a multiplicação de animais no rebanho. Os primeiros registros da produção de embriões no Brasil são do ano de 1980 através do processo *in vivo*, enquanto em 1995, começaram a ser disponibilizados, comercialmente, embriões produzidos *in vitro* (Viana et al., 2017; Gonçalves e Viana, 2019).

A produção *in vivo* consiste em selecionar vacas denominadas doadoras, submetê-las a tratamento hormonal exógeno para provocar uma superovulação de folículos, para, em sequência, inseminá-las e, após a fecundação, realizar lavagem uterina para recolhimento dos embriões e transferência para as receptoras. Embora essa seja uma biotécnica ainda muito utilizada para fêmeas taurinas (*Bos taurus*), devido a particularidade destes animais em produzir menor quantidade de oócitos por aspiração folicular (*Ovum pick up*; OPU) (Lima et al., 2023; Baruselli et al., 2019b; Jahnke et al., 2015), se trata de uma técnica onerosa e com alguns contratempos relacionados com a superovulação. Devido a estes e outros fatores, a produção *in vitro* começou a se destacar, sobretudo nas raças zebuínas (*Bos indicus*), por serem fêmeas que produzem um maior número de oócitos por OPU, permitindo a produção de um maior número de progênes de uma mesma fêmea ao longo do seu ciclo produtivo, a tornando atualmente a mais difundida e utilizada no país (Mikkola et al., 2019; IETS, 2022). Considerando o ranking internacional de países produtores de embriões, o Brasil ocupa o segundo lugar, estando atrás apenas dos Estados Unidos da América (IETS, 2022).

Através das etapas de produção de embriões provenientes de doadoras geneticamente superiores, é possível obter produtos de alto potencial genético, que serão transferidos para as receptoras, responsáveis pela continuidade do processo gestacional. Comparada à técnica da

inseminação artificial, a produção de embriões permite que o ganho genético seja obtido em um espaço inferior de tempo, devido a possibilidade de selecionar fêmeas jovens e de alto valor genético como doadoras; e touros de alto valor genético para serem os pais das gerações futuras. Assim, há redução do intervalo entre gerações e aumento da qualidade do produto disponibilizado ao mercado (Baruselli et al., 2019a; Goszczynski et al., 2019).

2.2. Etapas da produção *in vitro* de embriões

2.2.1. Aspiração folicular

No início da década de 1980, as aspirações foliculares aconteciam, principalmente, através de laparoscopia, laparotomia e ovariectomia (Callesen et al., 1987). Cerca de sete anos depois, Kruip et al. (1994) estudaram realizar a aspiração por meio da inserção de um transdutor transvaginal acoplado a guia de aspiração folicular. Assim, a partir dos estudos promovidos por Kruip et al. (1994) que a técnica atualmente utilizada começou a ser difundida, como evidenciada nos trabalhos de Garcia et al. (2020) e Velazquez (2023).

Na OPU utiliza-se aparelho portátil de ultrassonografia equipado com transdutor setorial para exame intravaginal e guia para agulhas descartáveis que são acopladas a sistema de vácuo, que permite que o material coletado caia dentro de um tubo. O objetivo da aspiração é obter o líquido folicular e os complexos de cumulus-oócitos que devem ser levados ao laboratório entre 3 a 12 horas em temperatura de 37° (Grázia, 2019). O ovário é posicionado na probe de aspiração, permitindo a visualização dos ovários e aspiração de todos os folículos visíveis acima de 2mm. Estes folículos aspirados são denominados folículos antrais terciários (Kruip et al., 1994; Manik et al., 2003).

Nesta técnica, alguns autores sugerem que uma vaca doadora pode ser aspirada de uma a duas vezes por semana por um período de três a cinco meses sem prejuízos no retorno a ciclicidade (Broadbent et al., 1997; Kruip et al., 1994). Porém, Harkal et al. (2019) relataram que a frequência de aspiração impacta no número de folículos e oócitos recuperados, sendo indicado que a OPU aconteça com intervalo mínimo de duas semanas. Garcia et al. (2020) ao estudarem a contagem de folículos antrais no momento da OPU, em animais da raça Nelore, encontraram que vacas acima de 25 folículos apresentam maiores números de oócitos, embriões e taxas gestacionais nas receptoras. Além disso, Feltes et al. (2022), ao estudarem características relacionadas à produção de embriões na raça Gir, encontraram alta repetibilidade para vacas com maior contagem de oócitos e embriões submetidas a primeira

OPU, o que demonstra que as vacas mantêm o padrão de produção nas próximas aspirações. Adicionalmente, cabe destacar que as aspirações podem ser realizadas em bezerras a partir de 10 a 16 semanas e até mesmo em animais gestantes a partir de 25 dias até os seus 6 meses de gestação (Brogliatti e Adams, 1996; Sauvé, 1998).

A aspiração de ovários provenientes de vacas de frigoríficos também pode ser realizada porém, de maneira geral, estas são direcionada para pesquisas (Hoeschele, 1990; Hasler et al., 1995). Segundo a IETS (2022), apenas 1,0% dos embriões produzidos no Brasil são provenientes de animais de frigoríficos. Para a produção de embriões comerciais, o aproveitamento dos folículos através de ovário de frigoríficos possui algumas desvantagens tais como impossibilidade de realizar a coleta em diferentes momentos do mesmo animal e falta de informações sobre a genética, saúde e perfil hormonal da doadora (Pellegrino, 2013).

Independente da técnica de coleta, após a aspiração dos folículos, os complexos cumulus-oócitos são direcionados ao laboratório onde são classificados quanto suas camadas de células do cumulus em cinco categorias (Shioya et al., 1988; Guemra et al., 2013), como evidenciado abaixo e na Figura 1:

- Grau I: ovócitos com mais de três camadas compactas e citoplasma homogêneo e uniformemente granuloso;
- Grau II: menos de três camadas de células compactas e citoplasma homogêneo e uniformemente granuloso;
- Grau III: única camada celular com aglomerados compactos e citoplasmáticos com aspecto irregular com áreas escuras;
- Grau IV: oócitos desnudados, sem aglomerados de células;
- Grau V: oócitos maturados *in vivo*, com aglomerado expandido.

Figura 1. Ovócitos bovinos de diferentes classificações obtidas por OPU



Fonte: Morera-Jiménez et al. (2022)

Esta classificação é fundamental para o sucesso da PIVE, onde oócitos de qualidade I e II são considerados de melhor qualidade e garantem maior probabilidade de desenvolvimento embrionário, demonstrando a importância das células do cumulus na maturação citoplasmática do oócito (Shioya et al., 1988; Sirard et al., 1989; Krisher, 2004), enquanto oócitos com as classificações IV e V são inviáveis.

2.2.2. Maturação *in vitro* (MIV)

Nos bovinos, fisiologicamente, o desenvolvimento dos oócitos durante a vida fetal estaciona em estágio de prófase I, ficando quiescente até o momento da ovulação. Portanto, o desenvolvimento do oócito imaturo retorna a partir de estímulos da ovulação onde, por recebem estímulos hormonais em condições *in vivo*, sofrem uma série de eventos nucleares e citoplasmáticos que culmina na configuração cromossômica em estágio de metáfase II, que preparam o oócito para a fertilização e o início do desenvolvimento (Sirard et al., 1989; Fissore et al., 2002; Roth e Hansen, 2005).

A comunicação entre as células somáticas que envolvem o oócito (células do cumulus) e o oócito é realizada por junções intercomunicantes que formam o complexo cumulus-oócito (CCO), importantes na nutrição e transporte dos componentes químicos regulatórios da maturação oocitária (Fissore et al., 2002; Roth e Hansen, 2005). Porém, durante o pico do hormônio luteinizante (LH) que precede a ovulação, ocorrem modificações nas células do cumulus, de modo que elas tornam-se suspensas e separadas por uma matriz de muco rica em ácido hialurônico, induzindo a expansão das células do cumulus durante a maturação. Assim, a maturação meiótica do oócito *in vivo* ocorre próximo ao momento da ovulação, na fase de estro na vaca, quando o pico pré-ovulatório de LH gera, em decorrência da expansão das células do cumulus, eventos nucleares e citoplasmáticos concomitantes no oócito (Roth e

Hansen, 2005). Assim, a maturação nuclear dura de 18 a 22 horas e compreende a fase de progressão do estágio de diplóteno da prófase I meiótica até a fase metáfase II, enquanto na maturação citoplasmática ocorrem modificações nas sínteses proteicas e reorganização das organelas citoplasmáticas que são fundamentais para a fecundação monospermica (Harris et al., 2020).

Para a PIVE, visto que os folículos são aspirados, preferencialmente, na fase de divergência folicular com diâmetros de 2-8mm, o processo de maturação meiótica do oócito precisa ocorrer *in vitro*, onde se deve fornecer condições adequadas laboratorialmente a fim de se obter a completa maturação. Destaca-se que, neste processo, ao ser retirado do folículo, o oócito reinicia de forma espontânea a meiose e pode progredir espontaneamente até o estágio de metáfase II (Sirdard et al., 1989).

Assim, com o objetivo de fornecer adequado ambiente *in vitro* para a maturação oocitária, os complexos cumulus-oócitos são colocados em gotas de 50 µl de meio específico, contendo substâncias definidas de acordo com cada laboratório. De maneira geral, utilizam-se meios de incubação (TCM-199) com piruvato de sódio, hormônio folículo estimulante (FSH), LH, 17-β estradiol, gentamicina e glutamina, cobertas por óleo mineral a uma temperatura de 39°C por 22 a 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂ em 95% de ar e umidade saturada. (Sirdard et al., 1989; Takahashi et al., 2002; Roth e Hansen, 2005; Baruselli et al., 2007; Guemra et al., 2013; Adona et al., 2022). Dessa forma, após o processo de maturação oocitária, o oócito pode ser fecundado.

2.2.3. Fertilização *in vitro* (FIV)

No ambiente *in vivo*, os espermatozoides bovinos ao serem depositados na porção cervico-vaginal, em monta natural, ou no corpo uterino, na inseminação artificial, passam por um processo de seleção até chegarem ao oviduto, enquanto vão sofrendo eventos relacionados com a capacitação espermática. Os eventos que envolvem a capacitação espermática ocorrem em condições *in vivo* durante o trânsito pelo trato reprodutor feminino onde existem glicosaminoglicanos que se ligam ao espermatozoide e são responsáveis pelo processo de capacitação, até que, no istmo da tuba uterina, o espermatozoide se liga nas criptas especializadas do epitélio e se soltam após a completa capacitação. Este processo resulta na desestabilização da membrana plasmática e hiperativação espermática, essenciais para a reação do acrossomo e para a penetração do espermatozoide no oócito (Harris et al., 2020).

Por outro lado, no ambiente *in vitro*, esta seleção inicial dos espermatozoides ocorre através do descongelamento do sêmen e deposição destes em um ambiente de Percoll. Este é um composto coloidal formado a partir de partículas de Sílica cobertas por polivinilpirrolidona, preparado em diferentes concentrações, formando o ambiente necessário para a separação/seleção espermática (Gorus e Pipeleers, 1981).

Assim sendo, o conteúdo de uma palheta de sêmen descongelado é depositado na superfície da solução de Percoll, sendo em seguida centrifugado e, posteriormente, removendo-se o sobrenadante. Neste processo de seleção espermática, no pellet final são obtidos, em sua maioria, espermatozoides viáveis. Posteriormente, para a ocorrência da capacitação *in vitro*, estes espermatozoides viáveis são suspensos em meios específicos contendo, geralmente, compostos de heparina, considerada um aminoglicosídeo que será responsável pelo início da capacitação espermática (Parrish et al., 1986; Guemra et al., 2013; Parrish, 2014).

No ambiente *in vivo*, após a capacitação espermática, o espermatozoide ativo fecunda o oócito maturo na ampola. Já no processo *in vitro*, o espermatozoide capacitado é colocado em gotas de fecundação contendo oócitos em uma concentração final variando de 1×10^6 a 2×10^6 espermatozoides/ml (Matos e Furnus, 2000; Adona et al., 2020) com penicilina, hipotaurina e epinefrina presentes nesta gota. Este processo recebe o nome de co-cultivo e é realizado em um período de 18-22 horas na temperatura de 39°C, atmosfera 5% de CO₂ em 95% de ar e umidade saturado permitindo que ocorra todo o processo de reação acrossomal e fecundação *in vitro* (Guemra et al., 2013; Adona et al., 2022).

Na presença de Ca⁺ extracelular o espermatozoide tem capacidade de se ligar a glicoproteína ZP3 presente na zona pelúcida do óvulo e através de carboidratos presente na ZP3 e nas proteínas similares à lecitina presentes na porção apical do espermatozoide a reação acrossomal se inicia, ligando agora o espermatozoide a ZP2. A reação acrossômica permite a liberação de enzimas que digerem a matriz da zona pelúcida e expõem o perfuratório, local que o espermatozoide penetra a zona pelúcida. A fusão do espermatozoide com o oócito ocorre após a sua penetração pelo contato do segmento equatorial do espermatozoide com a membrana plasmática do oócito, que incorpora este ao ooplasma. Com a penetração espermática, dois fenômenos ocorrem simultaneamente: a inclusão da carga genética paterna com reestabelecimento do número diploide (2n) de cromossomo e ativação do oócito, sendo necessária para o bloqueio da polispermia e o início das divisões de clivagem. A ativação do

oócito ocorre pela despolarização da membrana plasmática gerando hidrólise do fosfatidilinositolbifosfato, aumentando as oscilações intracelulares de Ca^+ ocorrendo a exocitose dos grânulos corticais, aumento do pH intracelular e da síntese proteica. Os sacarídeos presentes na zona pelúcida também sofrem ações glicosidases fazendo com que a zona pelúcida perca receptores espermáticos, tornando-se mais resistente à digestão enzimática e impedindo a polispermia (Harris et al., 2020; Dilimulati et al., 2022, Benko et al., 2022).

Após a penetração espermática ocorre a II divisão meiótica, a extrusão do II corpúsculo polar e os cromossomos que permaneceram no oócito são envolvidos por uma membrana nuclear formando o pró núcleo feminino. Concomitantemente a membrana nuclear do espermatozoide se desintegra descondensando a cromatina nuclear pela remoção de proteínas nucleares espermáticas específicas, formando uma nova membrana nuclear que envolve o cromossomo paterno dando origem ao pró núcleo masculino. Durante o desenvolvimento do pró núcleo feminino e masculino há migração para o centro do ooplasma. No centro do citoplasma ocorre a singamia, os pró núcleos se desintegram e os cromossomos se associam para ocorrer a I divisão mitótica (Parrish et al., 1986; Xu e Greve, 1988).

2.2.4. Cultivo in vitro de embriões (CIV)

O desenvolvimento embrionário em bovinos, que compreende o estágio de zigoto até blastocisto, é caracterizado por uma série de divisões celulares e mudanças essenciais para o crescimento e a continuidade do embrião (Lonergan et al., 2016). Após a fertilização, o zigoto, inicialmente formado por uma única célula volumosa, começa a sofrer divisões mitóticas sucessivas, processo denominado clivagem. Cerca de 32 horas após a FIV, o zigoto atinge o estágio de duas células, progredindo para quatro e, posteriormente, oito células em aproximadamente 40 horas. Nessa fase inicial, o desenvolvimento embrionário depende do mRNA materno presente no oócito. No entanto, ao atingir o estágio de oito células, ocorre a ativação do genoma embrionário, que é um momento crítico no qual proteínas maternas são substituídas por proteínas embrionárias, permitindo o progresso das divisões mitóticas. Esse período coincide com uma alta atividade de apoptose celular, indicando a importância da reprogramação molecular para a continuidade do desenvolvimento (Gjørret et al., 2003; Graf et al., 2014).

A partir do estágio de 9-16 células, que ocorre em cerca de 100 horas pós-FIV, o embrião bovino continua sua trajetória de desenvolvimento. Ao atingir 32 células (117 horas

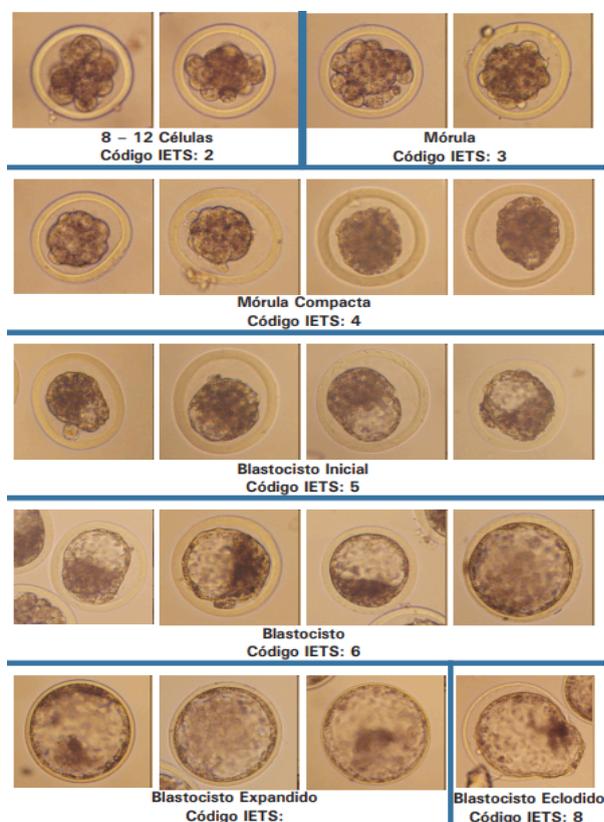
pós-FIV), o embrião entra na fase de mórula, marcada pela compactação dos blastômeros mediada por proteínas presentes na membrana celular, resultando na alteração de sua arquitetura e maior adesão celular. Em seguida, com 64 células (160 horas pós-FIV), inicia-se a fase de blastocisto, caracterizada pela formação da blastocèle devido ao acúmulo de fluido no interior do embrião, impulsionado pela compactação prévia. Esse acúmulo de fluido, juntamente com novas divisões celulares, torna o blastocisto progressivamente mais expansivo (Lindner e Wright, 1983; Gjørret et al., 2003; Lonergan et al., 2016). Durante este período, o embrião se desloca da tuba uterina para o útero, onde é encontrado no estágio de blastocisto ao redor do 7º dia após a fertilização, pronto para a próxima etapa de seu desenvolvimento (Lonergan et al., 2016).

Com objetivo de mimetizar o ambiente *in vivo*, os laboratórios utilizam placas de cultivos. Nestas placas, existem meio de cultivo mais complexos como TCM-199 ou mais simples como o fluido sintético de oviduto (SOF), suplementados com aminoácidos essenciais e não essenciais no soro fetal bovino (SFB) a 5%, cultivados a uma temperatura de 38,58°C em baixa concentração de O₂ sendo 5% CO₂, 90% N₂ E 5% DE O₂, por 8 dias evoluído para estágio de blastocisto (Takahashi et al., 2002). Um procedimento chamado *Feeding* é realizado pelos laboratórios em 48-96h após o início do cultivo, consistindo na troca do meio de cultura em gotas a cada dois dias, fornecendo nutrientes adequados ao desenvolvimento embrionário, removendo metabólicos tóxicos acumulados durante o cultivo (Takahashi et al., 2002). O momento para a realização do *Feeding* está relacionado com o período de ativação do genoma embrionário.

Ao final do período de cultivo *in vitro*, normalmente no 7º dia após a FIV, os embriões são classificados. Para classificação, os embriões devem ser analisados em estereomicroscópio em aumento 50 a 100x, sendo um bom preditor da viabilidade do embrião o seu estágio de desenvolvimento em relação ao estágio esperado em determinado dia após a fertilização. Portanto, o embrião pode ser classificado quanto ao estágio de desenvolvimento (Stringfellow et al., 1999) (Figura 2). É importante que o embrião seja compacto e esférico, de coloração e textura uniformes e que apresente tamanho semelhante entre os blastômeros, sem granulação ou vesículas no citoplasma e com espaço perivitelino limpo e sem debris celulares, com a zona pelúcida uniforme (Bó e Mapletoft, 2013). De acordo com Stringfellow et al. (1999) os embriões são classificados para o desenvolvimento embrionário através de um código numérico que varia de 1 a 9, sendo: 1: ovócito não fertilizado ou embrião de 1 célula;

2: estágio de desenvolvimento de 8-16 células; 3: mórula, com massa de pelo menos 16 células onde a massa celular do embrião ocupa a maior parte do espaço perivitelinio; 4: mórula compacta, formação da massa compacta, com a massa embrionária ocupando 60% a 70% do espaço perivitelinio; 5: formação da blastocele, onde o embrião forma uma cavidade cheia de líquido e o embrião ocupa cerca de 70% a 80% do espaço perivitelinio; 6: blastocisto em que há diferenciação entre a camada externa de trofoblasto e da massa celular interna mais escura e compacta, blastocele proeminente com o embrião ocupando a maior parte do espaço perivitelinio; 7: blastocisto expandido, aumento significativo do embrião com afinamento da zona pelúcida em um terço a espessura original; 8: blastocisto eclodido, embrião passa pela fase de eclosão ou já totalmente sem a zona pelúcida; 9: blastocisto eclodido em expansão.

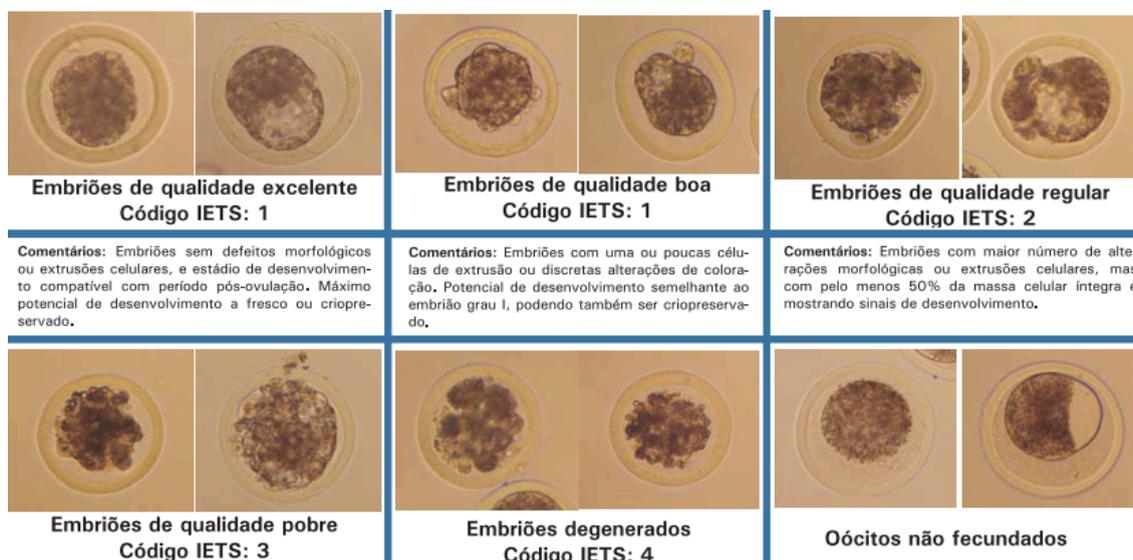
Figura 2. Classificação de embriões bovinos de acordo com o desenvolvimento embrionário



Fonte: Viana (2009)

A realização da classificação dos embriões de acordo com a qualidade morfológica é realizada no dia 7 de CIV e, de acordo com Stringfellow et al. (1999), a avaliação é de 1 a 4 pontos (Figura 3), sendo 1: excelente ou bom, embriões com massa simétrica e esférica com blastômeros individuais, uniformes em tamanho cor e densidade, com zona pelúcida lisa, estes embriões suportam o processo criopreservação ou a transferência a fresco; 2: justo, com pelo menos 50% da massa embrionária intacta, com irregularidades moderadas na sua forma ou tamanho, transferíveis, mas não congeláveis; 3: pobre, com pelo menos 25% da massa embrionária intacta, com grandes irregularidades na sua forma ou tamanho, não congeláveis e se transferidos a fresco possui menor taxa de gestação, quando comparado a embriões de boa qualidade; 4: morto ou degenerado, podendo ser embriões de 1 célula ou oócitos, inviáveis e devem ser descartados.

Figura 3. Classificação de embriões bovinos de acordo com a qualidade morfológica



Fonte: Viana (2009)

Após sua classificação, os embriões poderão então ser transferidos a fresco ou serem criopreservados por métodos de congelamento ou vitrificação.

3. CONCLUSÃO

A PIVE configura-se como uma biotecnologia consolidada e em contínua evolução, exercendo papel relevante na reprodução e no melhoramento genético de bovinos. A compreensão aprofundada dos eventos fisiológicos que ocorrem naturalmente, bem como de suas repercussões nas condições *in vitro*, é fundamental para o aperfeiçoamento de cada etapa do processo, resultando em ganhos expressivos em eficiência reprodutiva e qualidade embrionária. Ademais, a constante atualização dos protocolos laboratoriais, fundamentada em evidências científicas, reforça a importância estratégica dessa biotécnica no avanço da pecuária moderna.

REFERÊNCIAS

- ADONA, Paulo Roberto et al. In vitro fertilization: productivity of donors of different bovine breeds. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 5, p. 2749-2752, mai. 2020.
- ADONA, Paulo Roberto et al. Fertility analysis of bovine semen by in vitro fertilization. **Tropical Animal Health and Production**, v. 54; n. 137, p. 1-5, mar. 2022.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES (ABIEC). **Beef report**. Distrito Federal, 2023. Disponível em: <https://www.abiec.com.br/wp-content/uploads/Final-Beef-Report-2023-Completo-Versao-web.pdf>. Acesso em: 03 abr. 2024.
- BARUSELLI, Pietro Sampaio et al. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 205-211, abr/jun. 2007.
- BARUSELLI, Pietro Sampaio et al. Challenges to increase the AI and ET markets in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 364-375, out. 2019a.
- BARUSELLI, Pietro Sampaio et al. Estratégias para aumentar a produção de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 2, p. 315-326, abr/jun. 2019b.
- BENKO, Filip et al. In vitro versus cryo-induced capacitation of bovine spermatozoa, part 2: Changes in the expression patterns of selected transmembrane channels and protein kinase A. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 23, p. 1-23, nov. 2022
- BÓ, Gabriel. Amilcar.; MAPLETOFT, Reuben John. Evaluation and classification of bovine embryos. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 344-348, jul/set. 2013.
- BROADBENT, Peter et al. Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulatory response in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 5, p. 1027-1040, abr. 1997.

BROGLIATTI, Guillermo Mariano.; ADAMS, Gregg Patrick. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. **Theriogenology**, v. 45, n. 6, p. 1163-1176, abr. 1996.

CALLESEN, Henrik et al. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, p. 217, jan. 1987.

DILIMULATI, Kamila et al. Identification of sperm-binding sites in the n-terminal domain of bovine egg coat glycoprotein ZP4. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, p. 1-17, jan. 2022.

FELTES, Giovani Luis et al. Genetic evaluation of oocyte and embryo production in dairy Gir cattle using repeatability and random regression models. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 51, p. 1-19, set. 2022.

FISSORE, Rafael et al. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. **Reproduction**, v. 124, n. 6, p. 745-754, dez. 2002.

GARCIA, Sheilla Merlo et al. Synchronization of stage of follicle development before OPU improves embryo production in cows with large antral follicle counts. **Animal Reproduction Science**, v. 221, p. 1-8, out. 2020.

GUEMRA, Samuel et al. Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1616-1624, dez. 2013.

GIL, Maria et al. Advances in swine in vitro embryo production Technologies. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 2, p. 40-48, mai. 2010.

GJØRRET, Jakob et al. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p. 1193-1200, out. 2003.

GONÇALVES, Rômany Louise Ribeiro; VIANA, João Henrique Moreira. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. **Animal Reproduction**, v. 43, n. 2, p. 156-159, abr./jun. 2019.

GORUS, Frank. K.; PIPELEERS, Daniel. A rapid method for fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. **Fertility and Sterility**, v. 35, n. 6, p. 662-665, jun. 1981.

GOSZCZYNSKI, Daniel et al. In vitro breeding: application of embryonic stem cells to animal production. **Biology of Reproduction**, v. 100, n. 4, p. 885-895, abr. 2019.

GRAF, Alexander et al. Genome activation in bovine embryos: review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. **Animal Reproduction Science**, v. 149, p. 46-58, set. 2014.

GRÁZIA, João Gabriel Viana de. **Produção in vitro de embriões (PIVE) na bovinocultura de leite e de corte**. 2019. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2019.

HARKAL, Satish al. Effect of frequency of follicular aspiration on recovery of oocytes and follicular development. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 7, n. 6, p. 568-571, jan. 2019.

HARRIS, Emily et al. Extracellular Vesicles and the Oviduct Function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 1-20, nov. 2020.

HASLER, John et al. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v. 43, n.1, p. 141-152, jan. 1995.

HINRICHS, Katrin. In vitro production of equine embryos: state of the art. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 2, p. 3-8, jun. 2010.

HOESCHELE, Ina. Potential Gain from Insertion of Major Genes into Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 9, p. 2601-2618, set. 1990.

INTERNATIONAL EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY (IETS). **Statistics of embryo production and transfer domestic farm animals**. Champaign, 2022. Disponível em: https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2022.pdf. Acesso em: 17 mar. 2024.

JAHNKE Marianna et al. Evaluation of In Vivo-Derived Bovine Embryos. **Bovine Reproduction**. v. 1, n.79, p. 733-748, ago. 2015.

KRISHER, Rebecca. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. E14-E23, 2004.

KRUIP, Theo et al. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, v. 42, n. 4, p. 675-684, set. 1994.

LIMA, Wagner Marques et al. Estudos para o incremento da produção de embriões in vivo e in vitro em vacas de corte taurinas e sintéticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 47, n. 2, p. 191-194, abr./jun. 2023.

LINDNER, Gary.; WRIGHT JR, Raymond. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v. 20, n. 4, p. 407-416, out. 1983.

LONERGAN, Pat et al. Embryo development in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 270-277, jul. 2016.

MANIK, Radheysham et al. Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles in an Indian breed of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 76, n. 2, p. 155-161, abr. 2003.

MATOS, Daniel Gustavo.; FURNUS, Cecília. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cysteine. **Theriogenology**, v. 53, n. 3, p. 761-771, fev. 2000.

- MIKKOLA, Marja et al. Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, n. 2, p. 104-124, jan. 2019.
- MORERA-JIMÉNEZ, Alba et al. Response to ovarian stimulation by FSH (folltropin®) and OPU performance in adult cows obtained by different assisted reproduction techniques. **Annals of Veterinary Medicine of Murcia**. v. 36, p. 1-17, abr. 2022.
- PARRISH, John et al. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 25, n. 4, p. 591-600, abr. 1986.
- PARRISH, John. Bovine In vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 67-73, jan. 2014.
- PELLEGRINO, Carlos Augusto Gontijo. **Avaliação econômica da produção in vitro de embriões bovinos de diferentes grupos genéticos em sistema comercial**. 2013. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2013.
- ROTH, Zvi.; HANSEN, Peter James. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, v. 129, n. 2, p. 235-244, fev. 2005.
- SAUVÉ, Roger. Ultrasound guided follicular aspiration and in vitro fertilization. In: REUNIÃO ANUAL DA SBTE. Porto Alegre. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**. V. 13, p. 141-155, 1998.
- SHIOYA, Yasuo et al. In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. **Theriogenology**, v. 30, n. 3, p. 486-496, set. 1988.
- SIRARD, Marc André et al. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 6, p. 1257-1263, jun. 1989.
- SOUZA-FABJAN, Joanna Maria Gonçalves et al. In vitro production of small ruminant embryos: late improvements and further research. **Theriogenology**, v. 81, n. 9, p. 1149-1162, jun. 2014.
- STRINGFELLOW, David et al. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões: um guia de procedimentos e informações gerais para uso da tecnologia de transferência de embriões enfatizando procedimentos sanitários**. Uberlândia: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões (SBTE), 1999.
- TAKAHASHI, Michinori et al. Promoting effect of beta- mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 3, p. 562-567, mar. 2002.
- VELAZQUEZ, Miguel. Nutritional Strategies to Promote Bovine Oocyte Quality for In Vitro Embryo Production: Do They Really Work? **Veterinary Sciences**, v. 10, n. 10, p. 1-16, out. 2023.

VIANA, João Henrique Moreira. Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009. (Embrapa Gado de Leite. Comunicado técnico, 59, p. 4). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/853312>. Acesso em: 20 abr. 2024.

VIANA, João Henrique Moreira et al. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 476-481, jan. 2017.

XU, Kangpu.; GREVE, Torben. A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes. **Journal Reproduction Fertility**, v. 82, n. 1, p. 127-134, jan. 1988.