



Produção *in vitro* de embriões ovinos: avanços e desafios

In vitro production of sheep embryos: advances and challenges

N.A.S. Rocha-Frigoni¹, B.C.S. Leão¹, M.A.R. Feliciano^{2,3}, W.R.R. Vicente², M.E.F. Oliveira²

¹Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Unesp, Araçatuba, SP, Brasil.

²Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal, SP, Brasil.

³Correspondência: marcusfeliciano@yahoo.com.br

Resumo

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma ferramenta interessante, que pode ser aplicada na tentativa de transpor as limitações inerentes à espécie ovina, como a estacionalidade reprodutiva, a inseminação artificial transcervical, a variabilidade na resposta aos protocolos de superovulação, as falhas na fertilização, bem como a necessidade de cirurgia para coleta e transferência de gametas e embriões. Os embriões produzidos podem ser transferidos para receptoras ou criopreservados para uso futuro. As taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* ainda são significativamente inferiores, quando comparadas à situação *in vivo*, o que pode ser atribuído a deficiências tanto na maturação nuclear quanto na citoplasmática, além do bloqueio do desenvolvimento embrionário. A composição dos meios de cultivo e as condições de incubação estabelecidas interferem de maneira contundente no sucesso dessa biotécnica. Nesse contexto, a suplementação com antioxidantes e fatores de crescimento durante as diferentes etapas da PIV tem sido amplamente utilizada visando ao aprimoramento da técnica e da qualidade dos embriões obtidos. Nesta revisão, serão discutidos os avanços e os desafios dessa biotécnica, aplicada a ovinos, nas diferentes etapas compreendidas.

Palavras-chave: embrião, maturação *in vitro*, fecundação *in vitro*, cultivo *in vitro*.

Abstract

In vitro production (IVP) of embryos is an interesting tool that can be applied in an attempt to overcome the main limitations of a wider application in ovine reproduction, we can cite the naturally occurring anoestrus period, the variability of response to superovulatory treatments, the fertilization failure and the need for surgery for the collection and transfer of gametes and embryos. The embryos can be transferred to recipients or cryopreserved for future use. The in vitro production of embryos is still significantly lower when compared to in vivo, which can be attributed to compromised nuclear and cytoplasmic maturation and embryonic development failure. The composition of the culture media and the incubation conditions established may interfere with the success of this biotechnology. In this context, supplementation with antioxidants and growth factors during the different stages of IVP production has been widely used in order to improve the technique and quality of embryos. This paper reviews the advances and challenges of this biotechnology in sheep, analyzing the different stages included.

Keywords: embryo, in vitro culture, in vitro fecundation, in vitro maturation.

Introdução

A produção *in vitro* (PIV) apresenta-se como estratégia interessante e de baixo custo para obtenção de embriões destinados à pesquisa básica, estudo da fisiologia do desenvolvimento embrionário, aplicação em programas de melhoramento genético e suporte a biotecnologias emergentes (Baldassare et al., 2002). Ademais, permite a produção de progênes de elevado valor genético, quando a múltipla ovulação e a transferência de embriões (MOTE) não podem ser aplicadas (Cognié et al., 2004).

Em meados da década de 80, foram obtidos os primeiros cordeiros oriundos da fertilização *in vitro* de oócitos maturados *in vitro* ou *in vivo* (Cheng et al., 1986). Alguns anos após, foi relatado o nascimento do primeiro cordeiro obtido após maturação, fecundação e cultivo *in vitro* (CIV) até o estágio de mórula (Czlonkowska et al., 1991). No entanto, no início da última década, muito pouco ainda se conhecia sobre as necessidades metabólicas de embriões de ruminantes (Thompson, 2000). Desde então, várias pesquisas têm procurado mimetizar *in vitro* as condições de produção *in vivo* de embriões, a fim de aprimorar a eficiência dessa biotécnica, visto que as taxas de desenvolvimento embrionário na espécie ovina ainda podem ser consideradas baixas, com variação de 25% (Cognié et al., 2003) a 40,4% (Cocero et al., 2011), e a qualidade dos embriões obtidos *in vitro* é inferior quando estes são comparados aos obtidos *in vivo* (Lonergan e Fair, 2014).

Diversos estudos nessa espécie contribuíram substancialmente para o desenvolvimento da PIV em outras espécies, principalmente em relação aos sistemas de cultivo *in vitro*. Podem-se citar a utilização de cocultivo com células do oviduto e a utilização de baixas tensões de oxigênio (3-9%) durante o CIV de embriões



ovinos, posteriormente empregadas para a PIV de embriões bovinos (Bernardi, 2005).

Apesar dos esforços voltados para aperfeiçoar as técnicas de PIV, a produção embrionária ainda está longe do ideal. Além disso, há a necessidade de melhorar a qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro* comparados aos produzidos *in vivo* (Cognié et al., 2003). Pelo exposto, esta revisão objetiva abordar os avanços e os desafios de cada uma das etapas que compreendem a PIV de embriões ovinos.

Produção *in vitro* de embriões ovinos

A PIV de embriões compreende as etapas de maturação *in vitro* dos oócitos (MIV), capacitação espermiática, fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) dos zigotos até o estágio de mórula ou blastocisto. Os embriões produzidos podem ser transferidos para fêmeas receptoras, ou criopreservados para futuro uso. O sucesso dessa técnica tem sido demonstrado em bovinos, ovinos e outras espécies (Bavister et al., 1995; Tervit et al., 1995; Ptak et al., 1999).

No entanto, a habilidade de desenvolvimento de oócitos maturados, fecundados e cultivados *in vitro* é significativamente inferior, quando comparada com aqueles produzidos *in vivo* (Accardo et al., 2004), o que pode ser atribuído a deficiências tanto na maturação nuclear (Ptak et al., 2006) quanto na citoplasmática, entre outros eventos. Desta forma, o aprimoramento dos sistemas de PIV de embriões ovinos deve ser realizado levando-se em consideração as particularidades e as necessidades metabólicas dessa espécie e não apenas a transposição dos conhecimentos referente a essa biotécnica aplicada em bovinos.

Maturação *in vitro*

A MIV é influenciada pela origem e qualidade dos oócitos, pelas condições de incubação e pela composição dos meios utilizados (Cocero et al., 2011). Os oócitos podem ser obtidos por aspiração de ovários oriundos de abatedouro (*post mortem*) e *in vivo* por meio de laparotomia e laparoscopia (LOPU; Cognié et al., 2004), em animais púberes e pré-púberes (Amiridis e Cseh, 2012). Oócitos obtidos de fêmeas pré-púberes, entre três e quatro meses de idade, possuem menor competência de desenvolvimento até o estágio de blastocisto, em decorrência da maior ocorrência de polispermia e do atraso na progressão meiótica (Bernardi, 2005; Amiridis e Cseh, 2012). Oócitos de folículos menores (2-3 mm) possuem menor competência, pela ausência de eventos relacionados à maturação que ocorreriam em estágios finais do crescimento folicular. O tratamento com gonadotrofinas anteriormente à realização da LOPU possibilita a recuperação de oócitos de folículos maiores com qualidade e competência de desenvolvimento superior e, ao mesmo tempo, suprime o desenvolvimento de folículos dominantes (Cognié et al., 2004). Desta forma, a aspiração folicular de fêmeas previamente sincronizadas e superestimuladas (FSH) permite a padronização dos oócitos recuperados e melhora a competência oocitária *in vitro* (Bernardi, 2005).

A heterogeneidade da origem oocitária, em decorrência das diferenças do estágio do ciclo estral e da foliculogênese, influência do tamanho folicular e do processo de atresia, torna sua qualidade e competência extremamente variáveis e interfere na eficiência das etapas da PIV de embriões (Paramio, 2010). Assim, a alteração da composição dos meios de maturação pode afetar a competência oocitária, como consequência da síntese de proteínas e do RNAm durante a MIV e o suporte do desenvolvimento embrionário inicial, o que reflete na produção e na qualidade de blastocistos obtidos *in vitro* (Shirazi et al., 2012).

Após a obtenção dos oócitos, aqueles que possuem, no mínimo, de três a quatro camadas de células do *cumulus*, citoplasma uniformemente granulado e com coloração homogênea são selecionados para a maturação. Durante a MIV, oócitos imaturos devem completar a maturação nuclear e a citoplasmática e, portanto, permitir a fecundação e o desenvolvimento embrionário subsequente (Cocero et al., 2011).

Nas condições *in vitro*, a maturação oocitária pode ser influenciada pela composição do meio de cultivo e pelas condições estabelecidas durante essa etapa (Cognié et al., 2004). Está bem estabelecido que a MIV de oócitos ovinos é realizada na temperatura de 38-39°C por 22-24 h, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar e 100% de umidade (Amiridis e Cseh, 2012). Oócitos imaturos se tornam aptos à fertilização após alcançarem a maturação nuclear, quando há extrusão do primeiro corpúsculo polar e a metáfase II é atingida (Cognié et al., 2003), e a citoplasmática, por meio de alterações estruturais e moleculares e da redistribuição de organelas (Cocero et al., 2011; Amiridis e Cseh, 2012). O meio de cultivo mais utilizado é o TCM-199 (“Tissue Culture Medium” - 199), suplementado com piruvato, bicarbonato, FSH, LH, estradiol (E₂) e 10% de soro fetal bovino (SFB; Cocero et al., 2011). A utilização de células da granulosa nos sistemas de PIV de embriões ovinos, em concentrações que variam entre 2 e 5 x 10⁶ células/mL de meio de maturação, diminuiu com o passar do tempo, visto que a suplementação com as gonadotrofinas FSH e LH foi estabelecida nos protocolos de MIV (Bernardi, 2005).

A suplementação com SFB é rotineiramente utilizada como fonte proteica na MIV em diversas espécies (Shirazi et al., 2010; Mingoti et al., 2011). O efeito benéfico do SFB deve-se à presença de hormônios, vitaminas, fatores de crescimento, lipídeos e proteínas que auxiliam tanto na maturação nuclear quanto na citoplasmática (Shirazi et al., 2012). No entanto, a presença de substâncias desconhecidas, hormônios, fatores de crescimento e contaminantes no SFB, bem como a variabilidade existente entre diferentes lotes, torna a sua



utilização limitada, uma vez que não há como estabelecer um meio de cultivo definido (Accardo et al., 2004). Outra macromolécula comumente utilizada como fonte proteica para o cultivo de oócitos ovinos é a albumina sérica bovina (BSA). Esse composto possui menor variabilidade em sua composição e, por isso, pode ser considerado um meio semidefinido (Accardo et al., 2004). Entretanto, a utilização de BSA em substituição ao SFB durante a MIV de oócitos ovinos reduziu a taxa de blastocistos independentemente do meio de cultivo utilizado, TCM-199 e “Synthetic Oviduct Fluid” (SOF; Shirazi et al., 2012). Atualmente, os estudos buscam realizar a MIV em meio de cultivo definido, sem a suplementação com SFB ou BSA, na tentativa de simular os eventos que ocorrem durante a foliculogênese, sem alterar o sucesso da PIV de embriões ovinos (Cognié et al., 2003).

Em substituição, a adição de soro de cabra ou de ovelha em estro também é utilizada em caprinos, sem apresentar diferenças na taxa de maturação (Tajik e Esfandabadi, 2003). Ademais, o fluido folicular (FF; Sutton et al., 2003), quando recuperado de folículos maiores que 4 mm, pode ser utilizado como suplemento (Sun et al., 1994). O FF possui esteroides, gonadotrofinas e fatores de crescimento como o IGF-I e o EGF (Guler et al., 2000). Vale destacar que a utilização de soro provém fonte de albumina, o que equilibra a osmolaridade e remove as espécies reativas de oxigênio (ROS; Guérin et al., 2001).

Apesar de o E₂ ser utilizado em alguns protocolos, seus efeitos na maturação e competência oocitária ainda são controversos (Cognié et al., 2004). Sabe-se que as gonadotrofinas hipofisárias (FSH e LH) e os esteroides participam na indução da maturação nuclear em oócitos ovinos (Moor e Trounson, 1977), na expansão das células da granulosa (Choi et al., 2001) e melhoram a qualidade embrionária (Galli e Moor, 1991). Todavia, em alguns estudos, os efeitos da presença ou ausência de gonadotrofinas nos meios de MIV (Wani, 2012), bem como a adição de E₂ em meio suplementado com FF, não exercem influência sobre as taxas de blastocistos e sobre a qualidade embrionária (Guler et al., 2000; Accardo et al., 2004). No entanto, em decorrência da maioria dos estudos serem realizados com meios indefinidos ou semidefinidos, o real efeito da adição de gonadotrofinas e do E₂ pode ser mascarado.

As condições estabelecidas durante a MIV também afetam a qualidade dos embriões PIV (Takahashi et al., 2002). Tensões supra-fisiológicas de oxigênio, como as utilizadas na PIV de embriões (aproximadamente 20% O₂), podem potencializar a formação de ROS durante o cultivo de oócitos e embriões (Bavister, 1995) e, por conseguinte, gerar estresse oxidativo. As ROS induzem reação em cadeia, a qual culmina em danos celulares e nucleares, entretanto a adição de antioxidantes pode reduzir tais danos e aprimorar a PIV em diversas espécies (Deleuze e Goudet, 2010). Nesse contexto, a adição de vitamina A (Rajesh et al., 2010), cisteamina (De Matos et al., 2002; Dattena et al., 2007) e β-mercaptoetanol (De Matos et al., 2002) melhora a competência oocitária quando estes são adicionados à etapa de MIV de oócitos ovinos. Porém, muitos estudos ainda devem ser realizados para se determinar exatamente qual antioxidante utilizar, a dose que deve ser adicionada, bem como em que momento.

Em ovinos, a adição de vitamina A durante a MIV e o CIV promoveu aumento nas taxas de blastocistos e no número total de blastômeros (Rajesh et al., 2010). Contrariamente ao esperado, a suplementação com diferentes concentrações (0, 50, 100, 200, 400 e 500 μM) de vitamina E (α-tocoferol) no meio de MIV não melhorou a competência oocitária e o desenvolvimento de embriões ovinos (Natarajan et al., 2010).

A suplementação com 100 μM de cisteamina na MIV de oócitos ovinos promoveu redução da concentração intracelular de peróxido de hidrogênio (H₂O₂; De Matos et al., 2002), aumento dos estoques de GSH intracelular, melhoria da qualidade embrionária, bem como o estabelecimento da gestação após transferência dos embriões (Dattena et al., 2007). Paralelamente, a suplementação com β-mercaptoetanol também promoveu incremento das concentrações intracelulares de GSH e redução dos níveis de H₂O₂ (De Matos et al., 2002).

A suplementação com fatores de crescimento na MIV, como o fator semelhante à insulina tipo I (IGF-I) e o fator de crescimento epidérmico (EGF), também desempenha importante papel sobre a maturação oocitária (Kelly et al., 2008). O IGF-I estimula a síntese proteica e, conseqüentemente, a maturação e o desenvolvimento embrionário (Palma et al., 1997). O EGF promove o aumento na síntese de AMPc pelos complexos *cumulus*-oócito (COCs) e, por conseguinte, induz a quebra da vesícula germinativa e a retomada da meiose *in vitro* (Downs et al., 1991). A adição de IGF-I e EGF nos meios de MIV ainda apresenta resultados controversos. De acordo com a literatura, a suplementação com IGF-I durante a MIV de ovinos promoveu aumento nas taxas das maturações nuclear e citoplasmática, e ainda, nas taxas de blastocistos (Kelly et al., 2008), ou não exerceu efeito algum (Guler et al., 2000). A suplementação com EGF durante a MIV de oócitos ovinos incrementou as taxas das maturações nuclear (MII; Wani et al., 2012) e citoplasmática, assim como de blastocistos (Guler et al., 2000). Porém, de acordo com Kelly et al. (2008), a adição desse fator não interferiu de maneira benéfica na PIV de embriões nessa espécie. Quando o IGF-I e o EGF foram suplementados simultaneamente ao meio de MIV definido, houve aumento nas taxas de clivagem e desenvolvimento até os estágios de mórula e blastocistos (Shabankareh e Zandi, 2010). Está estabelecido que tais suplementações, associadas ou não, durante a MIV, aceleram o processo de meiose (Purohit et al., 2005).

Os efeitos da suplementação com o hormônio de crescimento (GH) têm sido estudados em ovinos, assim como em outras espécies. Baseado em estudos *in vitro*, o GH promove melhoria da qualidade dos oócitos



pela coordenação dos eventos citoplasmáticos e nucleares inerentes ao processo de maturação (Izadyar et al., 1997). A adição de GH recombinante ovino promoveu aumento das taxas de oócitos em MII, blastocistos e eclosão (Shirazi et al., 2010).

Os componentes do meio de cultivo e as condições estabelecidas durante a MIV afetam a progressão da meiose e de eventos relacionados com a maturação citoplasmática. O meio mais comumente utilizado durante essa etapa é suplementado com hormônios (FSH e LH), SFB ou BSA. No entanto, a formulação de um meio de cultivo definido auxiliaria na elucidação das necessidades metabólicas e nutricionais de oócitos e embriões ovinos obtidos *in vitro* e, conseqüentemente no sucesso da PIV (Accardo et al., 2004). Desta forma, o aprimoramento das condições de incubação pelo enriquecimento dos meios com antioxidantes e/ou fatores de crescimento, adotados no processo de MIV de oócitos ovinos, pode resultar em melhorias na qualidade e competência oocitária, visto que atualmente as taxas de maturação nuclear (MII) obtidas giram em torno de 71-79% (Cognié et al., 2003; Bernardi, 2005), para posterior desenvolvimento embrionário, com estabelecimento de gestação e obtenção de descendentes normais e férteis.

Fecundação *in vitro*

Para a fecundação *in vitro* (FIV), pode ser utilizado sêmen fresco ou congelado. O emprego do sêmen congelado tem se tornado mais usual na rotina, devido à facilidade de aquisição e manipulação, quando comparado ao fresco. Ademais, o armazenamento do sêmen congelado supera a reduzida fertilidade do sêmen nos períodos de sazonalidade desfavorável (Amiridis e Cseh, 2012). Entretanto, o processo de criopreservação leva a danos espermáticos severos em ovinos (Romão et al., 2013), que podem não afetar a motilidade, mas reduzem a vida útil (tempo de viabilidade) e a capacidade fertilizante dessas células (Salamon e Maxwell, 2000). Apesar de as taxas de desenvolvimento embrionário não serem influenciadas pelo tipo de sêmen utilizado (fresco ou criopreservado; Lehloeny et al., 2010), a qualidade dos blastocistos obtidos foi superior quando se utilizou o sêmen fresco em relação ao criopreservado (Romão et al., 2013).

Independentemente do tipo de sêmen (fresco ou congelado), este deve ser submetido aos métodos de separação espermática, com o objetivo de se selecionarem espermatozoides móveis e morfologicamente normais (García-Álvarez et al., 2010). Os métodos comumente empregados são o “swim-up” (Shirazi et al., 2012) e a centrifugação em gradiente de densidade, como o Percoll (Bernardi, 2005; Freitas et al., 2007). Ambos os procedimentos para o preparo do sêmen permitem selecionar populações espermáticas com uma baixa porcentagem de células apoptóticas (Ricci et al., 2009).

A etapa de capacitação espermática é um processo que ainda necessita ser padronizado, uma vez que a capacitação prematura do sêmen ovino criopreservado pode resultar em grande variabilidade de resultados. Isso porque o ciclo de congelamento e descongelamento pode acelerar a maturação da membrana espermática e, assim, aumentar a proporção de espermatozoides capacitados e com reação acrossômica (Maxwell e Watson, 1996). Dessa forma, a vida útil dessas células bem como sua capacidade fertilizante são reduzidas (Salamon e Maxwell, 2000). Descreve-se, na literatura, a utilização de diversos meios capacitantes e períodos de incubação. Por exemplo, pode-se empregar o meio FIV contendo soro de ovelha em estro (Freitas et al., 2007) ou heparina, e ainda períodos de incubação que variam de 15 minutos a uma hora (Cognié et al., 2004).

Os meios mais utilizados são DM-Hepes (“Defined Medium” modificado; Bernardi, 2005), TCM-199, SOF, suplementado com bicarbonato e 2% de soro de ovelha (Freitas et al., 2007), e Tyrode’s (TALP), suplementado com hipotaurina e glutatona (Paramio, 2010).

Apesar dos avanços ocorridos nos últimos anos na PIV de embriões ovinos, poucas modificações foram realizadas na etapa de fecundação *in vitro*. Esse fato possibilita que mais estudos sejam realizados nesse campo, principalmente no que diz respeito à tentativa de padronização da metodologia de capacitação espermática *in vitro*, a fim de se buscarem melhores resultados nas taxas de fertilização.

Cultivo *in vitro*

Embora tenham ocorrido avanços na etapa de CIV nos últimos anos, esta ainda é considerada uma etapa limitante para o emprego da biotecnologia de PIV de embriões ovinos. Ainda, mesmo com uma redução de 15-20% da viabilidade embrionária, quando se compara o CIV ao cultivo *in vivo* de embriões, ainda é possível a obtenção de um grande número de embriões de uma mesma doadora (Bernardi, 2005). Em comparação às taxas obtidas com a PIV de embriões bovinos, as taxas de clivagem e de blastocistos foram de 58 e 29%, respectivamente, em ovinos, em comparação a 78,3 e 28,7%, em bovinos (Rizos et al., 2002). Essa variação entre embriões ovinos e bovinos se deve à sua aparente diferença de adaptabilidade às condições de CIV (Rizos et al., 2002).

O meio de CIV mais comumente utilizado é composto por SOF, suplementado com aminoácidos, BSA (meio semidefinido) e/ou SFB (meio indefinido; Bernardi, 2005). Cognié et al. (2004) relataram maior viabilidade, após a transferência, de embriões ovinos PIV em meio suplementado a partir dos dias dois e três do CIV com SFB. Quanto à atmosfera gasosa, a baixa tensão de oxigênio (5-7% O₂) vem sendo preferencialmente



utilizada por resultar em maior produção de blastocistos comparada à utilização de elevada tensão de oxigênio (20% O₂; Yuan et al., 2003).

Durante o CIV, pode-se utilizar o cocultivo tanto com células somáticas, em meio definido ou semidefinido, ou ainda realizar essa etapa *in vivo* em ovidutos de ovelhas (Amiridis e Cseh, 2012), quanto com células epiteliais de oviduto (do inglês, OOEC), “búfalo rat liver” (BRL) e células vero (Cognié et al., 2004), as quais exercem influência positiva sobre o desenvolvimento embrionário ao promoverem a eliminação de metabólitos tóxicos do meio e secreção de diversos fatores embriotróficos (Bavister, 1988).

Vem sendo proposto, também, o cultivo em ovidutos de ovelhas, como substituto da adição de SFB (Amiridis e Cseh, 2012). Entretanto, estudos com embriões bovinos CIV em ovidutos demonstraram que esses embriões apresentaram menor peso ao nascimento em comparação aos embriões CIV em meio SOF suplementado com SFB ou BSA (Lazzari et al., 2002). Outros estudos, por sua vez, não demonstraram efeito algum do sistema de CIV (SOF vs. OOEC vs. ovidutos) sobre a taxa de desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* na espécie ovina (Holm et al., 1994).

Não há estudos recentes que avaliem a suplementação com fatores de crescimento e/ou citocinas durante o CIV de embriões ovinos. Fry et al. (1992) realizaram a suplementação com 1000 U/mL de “Human Leukemia Inhibitory Factor” (hLIF), durante 48 h do CIV, de embriões ovinos recuperados seis dias após o estro. A adição do hLIF aumentou o número de blastocistos ovinos eclodidos após 48 h de CIV, o que resultou em taxas de concepção similares entre as receptoras involuadas imediatamente após a coleta dos embriões (três horas) ou após 48 h de CIV com hLIF.

A etapa de CIV é considerada um dos entraves para o sucesso do sistema de PIV de embriões ovinos. Ainda há um extenso campo de estudo quanto ao desenvolvimento e à padronização de meios de cultivo, como, por exemplo, a suplementação com fatores de crescimento e antioxidantes, a substituição ao uso do SFB, a fim de aperfeiçoar o sistema de cultivo para que haja um aumento do desenvolvimento e da qualidade dos embriões obtidos.

Conclusão

Vários avanços têm sido alcançados nos últimos anos sobre a PIV de embriões ovinos, todavia ainda existem diversos entraves que comprometem o sucesso e, conseqüentemente, a ampliação da aplicação dessa biotécnica. Apesar dos esforços voltados para aperfeiçoar as técnicas de PIV, a produção embrionária está longe do ideal. As taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* ainda são significativamente inferiores, quando comparadas à situação *in vivo*, o que pode ser atribuído a deficiências nas maturações nuclear e citoplasmática, além do bloqueio do desenvolvimento embrionário. A composição dos meios de cultivo e as condições de incubação estabelecidas nas diferentes etapas interferem de maneira contundente no sucesso dessa biotécnica. Além disso, há a necessidade de melhorar a qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro* comparados aos produzidos *in vivo*.

O aprimoramento das condições de incubação pelo enriquecimento dos meios com antioxidantes e/ou fatores de crescimento, adotados no processo de MIV de oócitos ovinos, pode resultar em melhorias na qualidade e competência oocitária. Mais estudos necessitam ser realizados na etapa da FIV, principalmente no que diz respeito à tentativa de padronização da metodologia de capacitação espermática *in vitro*, a fim de serem alcançados melhores resultados nas taxas de fertilização. O sistema CIV ainda é considerado uma etapa limitante para o emprego da PIV de embriões ovinos. Todavia, ainda assim, é possível a obtenção de um grande número de embriões de uma mesma doadora (Bernardi, 2005). Desta forma, o aprimoramento dos sistemas de PIV de embriões ovinos deve ser realizado levando-se em consideração as particularidades e as necessidades metabólicas dessa espécie e não apenas a transposição dessa biotécnica aplicada em bovinos.

Referências

- Accardo C, Dattena M, Pilichi S, Mara L, Chessa B, Cappai P.** Effect of recombinant FSH and LH on *in vitro* maturation of sheep oocytes; embryo development and viability. *Anim Reprod Sci*, v.81, p.77-86, 2004.
- Amiridis GS, Cseh S.** Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Anim Reprod Sci*, v.130, p.152-161, 2012.
- Baldassare H, Wang B, Kafidi N, Keefer C, Lazaris A, Karatzas CN.** Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* production technologies. *Theriogenology*, v.57, p.275-284, 2002.
- Bavister BD.** Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. *Hum Reprod*, v.1, p.91-148, 1995.
- Bavister BD.** Role of oviductal secretions in embryonic growth *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, v.29, p.143-154, 1988.
- Bernardi ML.** Produção *in vitro* de embriões ovinos. *Acta Sci Vet*, v.33, p.1-16, 2005.
- Cheng WTK, Moor RM, Polge C.** *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. *Theriogenology*, v.25, p.146, 1986.



- Choi YH, Carnevale EM, Steidel GE, Squires J, Squires EL.** Effects of gonadotrophins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology*, v.56, p.661-670, 2001.
- Cocero MJ, Alabart JL, Hammami S, Martí JI, Lahoz B, Sánchez P, Echegoyen E, Beckers JF, Folch J.** The efficiency of *in vitro* ovine embryo production using an undefined or a defined maturation medium is determined by the source of the oocyte. *Reprod Domest Anim*, v.46, p.463-470, 2011.
- Cognie Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P.** Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v.59, p.171-188, 2003.
- Cognie Y, Poulin N, Locatelli Y, Mermillod P.** State-of-the-art production, conservation and transfer of *in vitro*-produced embryos in small ruminants. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.437-445, 2004.
- Czlonkowska M, Eysymont U, Guskiewicz A, Kossakowski M, Dziak J.** Birth of lambs after *in vitro* maturation, fertilization and co-culture with oviductal cells. *Mol Reprod Dev*, v.30, p.34-38, 1991.
- Dattena M, Mara L, Ali A, Bin T, Cappai P.** Lambing rate using vitrified blastocysts is improved by culture with BSA and hyaluronan. *Mol Reprod Dev*, v.74, p.42-51, 2007.
- Deleuze S, Goudet G.** Cysteamine supplementation of *in vitro* maturation media: a review. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.476-482, 2010.
- De Matos DG, Herrera C, Cortvrindt R, Smitz J, Van Soon A, Nogueira D.** Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine *in vitro* embryo production. *Mol Reprod Dev*, v.62, p.203-202, 2002.
- Downs SM, Dow MP, Fagbohun CF.** The meiotic response of cumulus cell-enclosed mouse oocyte to follicle stimulating hormone in the presence of different macromolecules. *J Exp Zool*, v.258, p.373-383, 1991.
- Freitas VJF, Andrade MLL, Cajazeiras JB, Luz JV.** Produção *in vitro* de embriões em pequenos ruminantes explorados no nordeste do Brasil. *Acta Sci Vet*, v.35, p.781-786, 2007.
- Fry RC, Batt PA, Fairclough RJ, Parr RA.** Human leukemia inhibitory factor improves the viability of cultured ovine embryos. *Biol Reprod*, v.46, p.470-474, 1992.
- Galli C, Moor RM.** Gonadotrophin requirement for the *in vitro* maturation on sheep oocytes and their subsequent embryonic development. *Theriogenology*, v.35, p.1083-1093, 1991.
- García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Ramónb M, del Olmó E, Montorob V, Dominguez-Rebolledo AE, Bisbalb A, Jiménez-Rabadána P Pérez-Guzmána MD, Soler AJ.** Analysis of selected sperm by density gradient centrifugation might aid in the estimation of *in vivo* fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.74, p.979-988, 2010.
- Guérin P, Mouatassim SEL, Menezo Y.** Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update*, v.7, p.175-189, 2001.
- Guler A, Poulin N, Mermillod P, Terqui M, Cognié Y.** Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocyte. *Theriogenology*, v.54, p.209-218, 2000.
- Holm P, Walker SK, Seamark RF.** Embryo viability, duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized zygotes cultured *in vitro* or *in vivo*. *J Reprod Fertil*, v.107, p.175-181, 1994.
- Izadyar F, Van Tol HT, Colenbrander B, Bevers MM.** Stimulatory effect of growth hormone on *in vitro* maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. *Mol Reprod Dev*, v.47, p.175-180, 1997.
- Kelly JM, Kleemann DO, Maxwell WM, Walker SK.** Effects of insulin-like growth factor-I, epidermal growth factor and cysteamine on the *in vitro* maturation and development of oocytes collected from 6-to-8-week-old Merino lambs. *Reprod Fertil Dev*, v.20, p.570-578, 2008.
- Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duchi R, Kruip T, Niemann H, Galli C.** Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro* produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod*, v.67, p.767-775, 2002.
- Lehloenya KC, Mahoete N, Greyling JPC, Nedambale TL.** Effect of breed and frozen-thawed ram semen on *in vitro* fertilization and ovine embryonic development. *Reprod Fertil Dev*, v.23, p.170, 2010.
- Lonergan P, Fair T.** The ART of studying early embryo development: progress and challenges in ruminant embryo culture. *Theriogenology*, v.81, p.49-55, 2014.
- Maxwell WMC, Watson PF.** Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.55-65, 1996.
- Mingoti GZ, Castro VS, Méo SC, Sá Barreto LS, Garcia JM.** The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine *in vitro* procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, v. 47, p. 361-368, 2011.
- Moor RM, Trounson AO.** Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil*, v.49, p.101-109, 1977.
- Natarajan R, Shankar MB, Munuswamy D.** Effect of alphatocopherol supplementation on *in vitro* maturation of sheep oocytes and *in vitro* development of preimplantation sheep embryos to the blastocyst stage. *J Assist Reprod Genet*, v.27, p.483-490, 2010.
- Palma GA, Müller M, Brem G.** Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on



- blastocyst development of bovine embryos produced *in vitro*. *J Reprod Fertil*, v.110, p.347-353, 1997.
- Paramio MT.** *In vivo* and *in vitro* embryo production in goats. *Small Rumin Res*, v.89, p.144-148, 2010.
- Ptak G, Dattena M, Loi P, Tischner M, Cappai P.** Ovum pick-up: efficiency of *in vitro* embryo production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology*, v.52, p.1105-1114, 1999.
- Ptak G, Matsukawa K, Palmieri C, Della Salda L, Scapolo PA, Loi P.** Developmental and functional evidence of nuclearimmaturity in prepubertal oocytes. *Hum Reprod*, v.21, p.2228-2237, 2006.
- Purohit GN, Brady MS, Sharma SS.** Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, v.87, p.229-239, 2005.
- Rajesh N, Shankar MB, Deecaraman M.** Effect of vitamin A supplementation at different gaseous environments on *in vitro* development of pre-implantation sheep embryos to the blastocysts stage. *Animal*, v.4, p.1884-1890, 2010.
- Ricci GMD, Perticarari SBS, Boscolo RBS, Montico MBS, Guaschino SMD, Presani GBS.** Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. *Fertil Steril*, v.91, p.632-638, 2009.
- Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland MP, Lonergan P.** Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Mol Reprod Dev*, v.62, p.320-327, 2002.
- Romão R, Marques CC, Baptista MC, Vasques MI, Barbas JP, Horta AEM, Carolino N, Bettencourt E, Plancha C, Rodrigues P, Pereira RM.** Evaluation of two methods of *in vitro* production of ovine embryos using fresh or cryopreserved semen. *Small Rumin Res*, v.110, p.36-41, 2013.
- Salamon S, Maxwell WMC.** Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.77-111, 2000.
- Shabankareh HK, Zandi M.** Developmental potential of sheep oocytes cultured in different maturation media: effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor I and cysteamine. *Reprod Biol*, v.94, p.335-340, 2010.
- Shirazi A, Ardali MA, Ahmadi E, Nazari H, Mamuee M, Heidari B.** The effect of macromolecule source and type of media during *in vitro* maturation of sheep oocytes on subsequent embryo development. *J Reprod Infertil*, v.13, p.13-19, 2012.
- Shirazi A, Shams-Esfandabadi N, Ahmadi E, Heidari B.** Effects of growth hormone on nuclear maturation of ovine oocytes and subsequent embryo development. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.530-536, 2010.
- Sun FJ, Holm P, Irvine B, Seamark RF.** Effect of sheep and human follicular fluid on the maturation of sheep oocyte *in vitro*. *Theriogenology*, v.4, p.981-988, 1994.
- Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG.** Effects of *in vitro* and *in vivo* environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update*, v.9, p.35-48, 2003.
- Tajik P, Esfandabadi N.S.** *In vitro* maturation of caprine oocytes in different culture medium. *Small Rumin Res*, v.47, p.155-158, 2003.
- Takahashi M, Nagai T, Okamura N, Takahashi H, Okano A.** Promoting effect of beta-mercaptoethanol on *in vitro* development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. *Biol Reprod*, v.66, p.562-569, 2002.
- Tervit HR, Smith JF, McGowan LW, Pough PA.** Birth of lambs from embryos produced *in vitro* following laparoscopic recovery of follicular oocytes. *Proc Aust Soc Reprod Biol*, v.27, p.68. 1995. Abstract.
- Thompson JG.** *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos: a decade of achievement. *Anim Reprod Sci*, v.61, p.263-275, 2000.
- Wani AR, Khan MZ, Sofi KA, Lone FA, Malik AA, Bhat FA.** Effect of cysteamine and epidermal growth factor (EGF) supplementation in maturation medium on *in vitro* maturation, fertilization and culturing of embryos in sheep. *Small Rumin Res*, v.106, p.160-164, 2012.
- Yuan YO, Van Soom A, Coopman FO, Mintiens K, Boerjan ML, Van Zeveren A, de Kruif A, Peelman LJ.** Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology*, v.59, p.1585-1596, 2003.
-