

PROTOCOLOS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES (PIVE) EM BOVINOS: ETAPAS DO LABORATÓRIO E MATURAÇÃO OOCITÁRIA

IN VITRO EMBRYO PRODUCTION (IVP) PROTOCOLS IN CATTLE: LABORATORY STAGES AND OOCYTE MATURATION

PROTOCOLOS DE PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO (PIV) EN BOVINOS: ETAPAS DE LABORATORIO Y MADURACIÓN DE OVOCITOS



10.56238/sevened2026.001-062

Carlos Roberto Cruz Ubirajara Filho

Docente em Medicina Veterinária

Instituição: Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE)

Thiago Carneiro Nascimento

Graduando em Medicina Veterinária

Instituição: Centro Universitário Vale do Rio Verde (UNINCOR)

Laura de Moraes Guazzelli

Bacharel em Medicina Veterinária

Instituição: Universidade de Brasília (UNB)

Kamilla Garcia Jayme

Graduanda em Medicina Veterinária

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)

Marcos Vinícius de Carvalho Botelho

Graduando em Medicina Veterinária

Instituição: Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS)

Olívia Corsini Pasinato

Bacharel em Medicina Veterinária

Instituição: Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUCAMP)

Henrique Leite França Gomes

Bacharel em Medicina Veterinária

Instituição: Universidade Federal de Sergipe (UFS)

Maria Antônia de Oliveira Santana

Bacharel em Medicina Veterinária

Instituição: Universidade Salvador (UNIFACS)

RESUMO

A produção in vitro de embriões (PIVE) é uma técnica muito utilizada na reprodução bovina para aumentar a eficiência reprodutiva e no melhoramento genético dos rebanhos. Esse processo permite produzir embriões em laboratório a partir de óvulos e espermatozoides selecionados de animais de alta eficiência genética. A PIVE é composta por três etapas laboratorial principais sendo elas:: maturação in vitro dos oócitos (MIV), fertilização in vitro (FIV) e cultivo embrionário. Entre estas fases, a maturação dos oócitos é considerada uma das mais importantes, pois prepara o gameta feminino para ser fertilizado e iniciar o desenvolvimento do embrião após fecundação com o gameta masculino.. Diversos fatores podem influenciar o sucesso da técnica, como a qualidade dos oócitos coletados e escolhidos, as características da doadora e as condições laboratoriais. Além disso, o ambiente de cultivo precisa ser cuidadosamente controlado para garantir o desenvolvimento adequado dos embriões até sua implantação na receptora. Mesmo com os avanços da técnica, ainda existem limitações que podem reduzir a taxa de formação de blastocistos viáveis na MIV. Por isso, pesquisas continuam sendo realizadas para melhorar os protocolos utilizados. Dessa forma, compreender melhor cada etapa da PIVE é essencial para aumentar sua eficiência e ampliar sua aplicação na produção animal.

Palavras-chave: PIVE. Bovinos. Maturação Oocitária. Fertilização In Vitro. Cultivo Embrionário. Oócitos. Blastocisto. Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

In vitro embryo production (IVP) is a widely used technique in bovine reproduction to increase reproductive efficiency and improve the genetic quality of herds. This process allows the production of embryos in the laboratory from selected eggs and sperm from animals with high genetic efficiency. IVP consists of three main laboratory stages: in vitro maturation of oocytes (IVM), in vitro fertilization (IVF), and embryonic culture. Among these phases, oocyte maturation is considered one of the most important, as it prepares the female gamete to be fertilized and initiate embryonic development after fertilization with the male gamete. Several factors can influence the success of the technique, such as the quality of the collected and selected oocytes, the characteristics of the donor, and the laboratory conditions. In addition, the culture environment needs to be carefully controlled to ensure the proper development of the embryos until their implantation in the recipient. Even with advances in technique, limitations still exist that can reduce the rate of viable blastocyst formation in IVM. Therefore, research continues to be conducted to improve the protocols used. Thus, a better understanding of each stage of IVP is essential to increase its efficiency and expand its application in animal production.

Keywords: IVP. Cattle. Oocyte Maturation. In Vitro Fertilization. Embryo Culture. Oocytes. Blastocyst. Oxidative Stress.

RESUMEN

La producción de embriones in vitro (PIV) es una técnica ampliamente utilizada en la reproducción bovina para aumentar la eficiencia reproductiva y mejorar la calidad genética de los rebaños. Este proceso permite la producción de embriones en el laboratorio a partir de óvulos y espermatozoides seleccionados de animales con alta eficiencia genética. La PIV consta de tres etapas principales de laboratorio: maduración in vitro de ovocitos (MIV), fertilización in vitro (FIV) y cultivo embrionario. Entre estas fases, la maduración de ovocitos se considera una de las más importantes, ya que prepara el gameto femenino para ser fertilizado e inicia el desarrollo embrionario tras la fertilización con el gameto masculino. Diversos factores pueden influir en el éxito de la técnica, como la calidad de los ovocitos recolectados y seleccionados, las características de la donante y las condiciones del laboratorio. Además, el entorno de cultivo debe controlarse cuidadosamente para asegurar el correcto desarrollo de los embriones hasta su implantación en la receptora. A pesar de los avances técnicos, aún existen limitaciones que pueden reducir la tasa de formación de blastocistos viables en la MIV. Por lo

tanto, se continúa investigando para mejorar los protocolos utilizados. Por lo tanto, una mejor comprensión de cada etapa de la FIV es esencial para aumentar su eficiencia y ampliar su aplicación en la producción animal.

Palabras clave: FIV. Ganado Bovino. Maduración de Ovocitos. Fecundación in Vitro. Cultivo de Embriones. Oocitos. Blastocisto. Estrés Oxidativo.

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) consolidou-se como uma biotecnologia indispensável para a pecuária global, permitindo a aceleração do ganho genético e o aumento da eficiência reprodutiva de doadoras de alto valor (Hansen, 2024; Salek et al., 2025). Essa técnica tem sido aplicada para melhorar a produtividade dos rebanhos, contribuindo para suprir as necessidades de alimento que a população mundial vem demandando (Salek et al., 2025). Além disso, há a ideia de no futuro desenvolver a "criação *in vitro*", gerando células-tronco a partir dos embriões produzidos *in vitro*, diferenciando-as em espermatozoides e oócitos e continuando o ciclo a partir de então (Hansen, 2024). Apesar do avanço na sua aplicação comercial, a eficiência do processo ainda enfrenta gargalos, especialmente no que tange à qualidade dos oócitos e à competência do desenvolvimento embrionário sob condições laboratoriais (Huang et al., 2023; Hansen, 2024). A PIVE é composta por três fases fundamentais: maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), sendo a primeira etapa considerada crítica para o sucesso final (Salek et al., 2025).

Dentre as etapas da PIVE há a maturação oocitária, que envolve uma complexa sequência de eventos moleculares e estruturais, incluindo a maturação nuclear e citoplasmática, que preparam o gameta feminino para a fertilização e o subsequente desenvolvimento embrionário (Hansen, 2024). Fatores intrínsecos à doadora, como raça, estado nutricional e genética, bem como variáveis extrínsecas relacionadas ao manejo laboratorial e à composição dos meios de cultura, exercem influência direta nos índices de produção de blastocistos (Zago et al., 2023; Huang et al., 2023). Portanto, o refinamento dos protocolos laboratoriais e a compreensão das necessidades metabólicas dos embriões produzidos *in vitro* são essenciais para reduzir as disparidades qualitativas em relação aos embriões produzidos *in vivo* (Laloë et al., 2025). Dessa forma, a maturação oocitária é vista como uma etapa determinante para prosseguir com o processo de PIVE, pois sendo feita adequadamente resultará no sucesso do desenvolvimento embrionário (Hansen, 2024; Huang et al., 2023).

O sucesso da PIVE depende diretamente dos procedimentos laboratoriais adotados, sendo necessária uma padronização dos protocolos utilizados (Salek et al., 2025). Sua eficiência pode ser comprometida devido às restrições experimentais que muitos laboratórios enfrentam, pois ainda há dificuldade em reproduzir adequadamente, em condições *in vitro*, o ambiente fisiológico do trato reprodutivo da fêmea em larga escala (Hansen, 2024). A qualidade oocitária também influencia diretamente em como se desencadeará o desenvolvimento embrionário, sendo importante identificar e selecionar as melhores doadoras antes de realizar a coleta de oócitos, com o objetivo de minimizar variações na eficiência da produção *in vitro* (Huang et al., 2023). Nesse contexto, este estudo tem como objetivo revisar e explicar os principais protocolos de produção *in vitro* de embriões bovinos, com foco principal nas etapas laboratoriais e na maturação oocitária.

2 METODOLOGIA

O presente estudo caracteriza-se como uma revisão bibliográfica narrativa, desenvolvida com o objetivo de sintetizar e analisar as evidências científicas mais recentes relacionadas aos protocolos de produção *in vitro* de embriões (PIVE) em bovinos, com ênfase nas etapas laboratoriais e maturação oocitária. A pesquisa foi realizada na base de dados PubMed, utilizando os descritores "In vitro production embryos" e "cattle", combinados por meio do operador booleano AND, conforme a terminologia do Medical Subject Headings (MeSH). Foram incluídos artigos publicados nos últimos trinta anos, disponíveis integralmente e redigidos nos idiomas português ou inglês, que abordassem de forma direta o tema. Excluíram-se estudos que não apresentavam relação direta com o tema central, publicações duplicadas, revisões narrativas com baixo rigor metodológico e artigos não indexados na base de dados utilizada. A seleção dos estudos foi conduzida em duas etapas: triagem de títulos e resumos, seguida pela avaliação dos textos completos para confirmar a relevância. As informações extraídas foram organizadas de forma descritiva.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV): O ALICERCE DA PIVE

A MIV é a etapa em que os oócitos imaturos, obtidos via aspiração folicular (OPU) ou de ovários de abatedouro, retomam a meiose até a metáfase II (Salek et al., 2025). Nesse estágio ocorre a quebra da vesícula germinativa, reorganização do fuso meiótico e extrusão do primeiro corpúsculo polar, eventos que caracterizam a retomada do ciclo meiótico. A progressão adequada até a metáfase II é essencial para que o oócito adquira competência para ser fertilizado e sustentar as primeiras divisões embrionárias após a fecundação (Hansen, 2024).

A eficácia desta fase depende da sincronia entre a maturação nuclear e a citoplasmática. A maturação nuclear refere-se às alterações cromossômicas e à progressão da meiose, enquanto a maturação citoplasmática envolve modificações metabólicas e estruturais no interior do oócito. Entre essas alterações destacam-se a redistribuição de organelas, o acúmulo de RNAs mensageiros e proteínas reguladoras e o rearranjo de grânulos corticais, elementos essenciais para o sucesso da fertilização e para o bloqueio da polispermia. A falta de sincronização entre essas duas formas de maturação pode comprometer a qualidade do oócito e reduzir significativamente o potencial de desenvolvimento embrionário (Hansen, 2024).

Protocolos modernos utilizam meios como o TCM-199, suplementados com hormônios (FSH, LH), soro fetal bovino (SFB) ou substitutos proteicos, além de antioxidantes para mitigar o estresse oxidativo. Esses componentes buscam reproduzir parcialmente o ambiente folicular fisiológico, fornecendo nutrientes, fatores de crescimento e suporte metabólico ao oócito em maturação. Os hormônios estimulam a expansão das células do cúmulus e promovem sinais moleculares que

favorecem a retomada meiótica, enquanto as proteínas séricas atuam como fontes de aminoácidos, lipídios e fatores bioativos importantes para o metabolismo celular (Salek et al., 2025).

Recentemente, pesquisadores têm investigado os benefícios da adição de moduladores metabólicos e antioxidantes nos meios de maturação, com o objetivo de reduzir os efeitos do estresse oxidativo gerado durante o cultivo *in vitro*. O excesso de espécies reativas de oxigênio causa danos às membranas celulares e ao DNA, comprometendo a qualidade do oócito e o desenvolvimento embrionário subsequente. Desse modo, a utilização destes compostos é uma estratégia para melhorar a competência oocitária e aumentar as taxas de desenvolvimento embrionário (Salek *et al.*, 2025).

A qualidade do oócito inicial, muitas vezes avaliada pela morfologia do complexo cumulus-oócito (COC), é um preditor determinante: COCs com múltiplas camadas de células e citoplasma homogêneo apresentam taxas de clivagem superiores (Seisenov et al., 2023; Huang et al., 2023). Através desse processo de classificação morfológica, os laboratórios de PIVE selecionam oócitos com maior potencial de desenvolvimento. Complexos classificados como de alta qualidade apresentam várias camadas compactas de células do cúmulus e citoplasma uniforme, características associadas a maior competência de maturação e maior capacidade de atingir o estágio de blastocisto (Seisenov *et al.*, 2023).

Por fim, a comunicação metabólica entre o oócito e as células do cúmulus desempenha papel fundamental durante a maturação do mesmo. Essas células auxiliam na transferência de metabólitos e regulam níveis intracelulares de nucleotídeos, como o AMP cíclico, responsáveis pela manutenção do bloqueio meiótico até que ocorram os estímulos adequados para a retomada da mesma. Dessa forma, a integridade estrutural do complexo cúmulus-oócito é considerada essencial para garantir a maturação adequada e o sucesso da produção embrionária *in vitro* (Hansen, 2024).

3.2 DINÂMICA DAS ETAPAS DE FERTILIZAÇÃO E CULTIVO

Após a maturação, os oócitos são submetidos à fertilização *in vitro* (FIV), onde a seleção espermática (via gradiente de densidade ou "swim-up") busca gametas com alta motilidade e integridade de DNA (Hansen, 2024). A seleção espermática permite separar espermatozóides morfolologicamente normais e metabolicamente ativos, de forma a aumentar o sucesso reprodutivo e reduzir a probabilidade de anormalidades cromossômicas, garantindo embriões de alta qualidade (Hansen, 2024).

Durante o processo de fertilização, os espermatozóides passam pelo processo de capacitação espermática, no qual ocorrem alterações bioquímicas na membrana plasmática que permitem a reação acrossômica e a penetração nas camadas do oócito. Após a fusão entre os gametas, ocorre a formação do zigoto, que inicia as divisões mitóticas responsáveis pela formação do embrião (Salek et al., 2025, Hansen, 2024).

O cultivo *in vitro* (CIV) subsequente, que dura geralmente de 7 a 8 dias até o estágio de blastocisto, exige um ambiente controlado com baixas tensões de oxigênio (geralmente 5%) para mimetizar o ambiente uterino e evitar danos oxidativos (Salek et al., 2025). O nível de oxigênio do ar atmosférico interfere no desenvolvimento saudável do embrião, há a produção de espécies reativas e interferência no desenvolvimento do blastocisto. Assim, o desenvolvimento em incubadora garante maior qualidade do produto. (Salek et al., 2025).

Durante o cultivo embrionário, os embriões passam por diferentes estágios de desenvolvimento, incluindo clivagem, mórula e blastocisto. A formação do blastocisto envolve a diferenciação celular em duas linhagens principais: a massa celular interna, que dará origem ao embrião propriamente dito, e o trofoblasto, responsável pela formação da placenta. A proporção adequada entre essas estruturas é um indicativo importante da qualidade embrionária e da capacidade de implantação após a transferência para receptoras (Hansen, 2024; Salek et al., 2025).

Inovações recentes sugerem que a manipulação de citocinas e fatores de crescimento no meio de cultivo pode melhorar a expansão da massa celular interna, resultando em embriões mais competentes para a gestação (Hansen, 2024).

3.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A EFICIÊNCIA PRODUTIVA

A variabilidade nos resultados da PIVE é influenciada significativamente pela raça da doadora. Estudos comparativos demonstraram que fêmeas de raças zebuínas (*Bos indicus*) tendem a produzir um maior número de COCs viáveis por sessão de OPU em comparação com raças europeias (*Bos taurus*), como a Holstein e a Flemish (Zago et al., 2023). Essa diferença pode estar relacionada à maiores quantidades foliculares observadas em animais *Bos indicus*, além de particularidades fisiológicas relacionadas à dinâmica ovariana dessas raças. Como consequência, programas de produção *in vitro* de embriões frequentemente apresentam maior número de oócitos recuperados quando utilizam doadoras zebuínas. (Zago et al., 2023, Salek *et al.*, 2025).

Além da genética, o ambiente metabólico do embrião *in vitro* difere substancialmente do *in vivo*. Análises metabolômicas revelam que embriões produzidos *in vitro* apresentam perfil de consumo de aminoácidos e metabólitos distintos, o que pode explicar a menor criotolerância e as alterações epigenéticas frequentemente observadas nestes grupos (Laloë et al., 2025).

Outros fatores que influenciam a eficiência produtiva são as injúrias relacionadas ao ambiente *in vitro*, tais como atmosfera gasosa, temperatura, suplementação do meio e manipulação de oócitos (Sovernigo *et al.*, 2017). Considerando que *in vivo*, isto é, no folículo, o oócito e o embrião pré-implantação estão constantemente expostos a antioxidantes endógenos presentes no fluido folicular e nas células somáticas que o circundam, a transferência para um ambiente de cultivo *in vitro* rompe esse equilíbrio redox fisiológico (Guérin *et al.*, 2001; Combelles et al., 2009). Nessas condições,

espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas (Santos *et al.*, 2019). Este processo ocorre, no caso dos oócitos, em parte devido à perda da defesa antioxidante do fluido folicular e se caracteriza pelo desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante do organismo (Roelen *et al.*, 2019; Pimenta *et al.* 2025). A consequência deste processo pode vir a ser o chamado estresse oxidativo, estado que prejudica drasticamente a qualidade do cultivo (Guerin *et al.*, 2001).

3.4 PERSPECTIVAS E LIMITAÇÕES

Apesar do sucesso comercial, a proporção de oócitos que efetivamente se tornam blastocistos viáveis ainda é limitada, muitas vezes não ultrapassando os 30-40% em protocolos convencionais (Hansen, 2024). Esse cenário evidencia a complexidade do processo de desenvolvimento embrionário e a dificuldade de reproduzir, em laboratório, as condições fisiológicas ideais presentes no ambiente uterino e ovidutal (Hansen, 2024; Salek *et al.*, 2025).

A busca por meios quimicamente definidos, que reduzam a dependência de componentes biológicos variáveis como o SFB, é uma prioridade para padronizar os resultados (Salek *et al.*, 2025). Adicionalmente, o desenvolvimento de modelos de estruturas semelhantes a blastocistos derivados de células-tronco (blastoides) abre novas fronteiras para o estudo da embriologia bovina sem a necessidade de oócitos de doadoras (Pinzón-Arteaga *et al.*, 2023).

4 CONCLUSÃO

A PIVE consolidou-se como ferramenta essencial para o avanço genético e a eficiência produtiva na bovinocultura. A técnica envolve três etapas interdependentes e importantes: maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV). Dentre elas, a maturação oocitária é considerada determinante para o sucesso e desenvolvimento embrionário. A sincronização adequada entre maturação nuclear e citoplasmática influencia diretamente a competência do oócito que posteriormente será maturado. Além disso, condições laboratoriais e composição dos meios de cultivo são decisivas para a qualidade embrionária. Apesar dos avanços tecnológicos, as taxas de blastocisto (D7) ainda são limitadas. Novas abordagens, como modelos embrionários derivados de células-tronco, ampliam as perspectivas científicas. Assim, o aprimoramento contínuo dos protocolos é fundamental para aumentar a eficiência e a sustentabilidade da PIVE e seus resultados.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista De Nutrição*, 23(4), 629–643. 2010 <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
- COMBELLES, C. M. H.; GUPTA, S.; AGARWAL, A. Could oxidative stress influence the in-vitro maturation of oocytes? *Reproductive BioMedicine Online*, Cambridge, v. 18, n. 6, p. 864–880, 2009. DOI: 10.1016/S1472-6483(10)60038-7.
- GUÉRIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, Oxford, v. 7, n. 2, p. 175–189, 2001. DOI: 10.1093/humupd/7.2.175.
- HANSEN, P. J. Pressing needs and recent advances to enhance production of embryos in vitro in cattle. **Animal Reproduction**, v. 21, n. 3, p. e20240036, 2024.
- HUANG, Y. et al. Phenotypic and Genetic Analyses of In Vitro Embryo Production Traits in Chinese Holstein Cattle. **Animals**, v. 13, n. 22, p. 3539, 2023.
- LALOË, D. et al. In vitro production significantly reduces metabolic differences among bovine embryos. **Metabolomics**, v. 22, n. 12, 2025.
- PIMENTA, L. K. L. et al. Melatonin during pre-maturation and its effects on bovine oocyte competence. **Antioxidants**, Basel, v. 14, n. 8, p. 969, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox14080969>
- PINZÓN-ARTEAGA, C. A. et al. Bovine blastocyst-like structures derived from stem cell cultures. **Cell Stem Cell**, v. 30, n. 5, p. 611-616, 2023.
- ROELEN, B.A.J. Bovine oocyte maturation: Acquisition of developmental competence. *Reprod. Fertil. Dev.* 2019, 32, 98–103
- SANTOS, M. V. O. et al. Syzygium aromaticum essential oil supplementation during in vitro bovine oocyte maturation improves parthenogenetic embryonic development. *Theriogenology*, v.128, p.74–80, 2019.
- SALEK, F. et al. Factors Affecting the Success of Ovum Pick-Up, In Vitro Production and Cryopreservation of Embryos in Cattle. **Animals**, v. 15, n. 3, p. 344, 2025.
- SEISENOV, B. et al. In Vitro Fertilization in Kazakh Whiteheaded Cattle: A Comparative Study. **Life**, v. 13, n. 8, p. 1632, 2023.
- SOVERNIGO, T.C.; et al.. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reproduction in Domestic Animals*, v.52, p.561–9, 2017.
- ZAGO, F. C. et al. In vitro and in vivo embryo production efficiency in Flemish and Holstein donor females. **Animal Reproduction**, v. 20, n. 3, p. e20230080, 2023.