

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES SUINOS

IN VITRO PRODUCTION OF SWINE EMBRYOS

Carolina Gonçalves Serret¹, Thomaz Lucia Júnior, João Carlos Deschamps, Marcio Nunes Corrêa

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões suínos (PIVES) é uma biotécnica que pode ser aplicada à suinocultura com o intuito de acelerar o melhoramento genético, disseminando o material genético a ser produzido em larga escala o que proporcionaria maior disponibilidade de um grande número de embriões para estudos de xenotransplante, transgênese e clonagem. Com o desenvolvimento da fecundação *in vitro* torna-se possível estudar eventos básicos da maturação e fecundação, utilizando os zigotos gerados para trabalhos científicos com cultivo, formação de bancos de germoplasma e importação e exportação do material genético. Porém, a PIVES é uma biotécnica que merece atenção especial, pelas dificuldades na produção *in vitro* de embriões, tornando imprescindível a implantação de uma rotina de pesquisa em laboratórios que trabalham com reprodução na espécie suína. O objetivo desta revisão é descrever as diferentes etapas da PIVES, abordando os processos fisiológicos de maturação e fecundação de oócitos, e ressaltando o impacto desta biotécnica sobre a cadeia produtiva da suinocultura.

Palavras-chaves: reprodução assistida, embriões, **Cumulus oophorus**, suínos.

ABSTRACT

The *in vitro* production of swine embryos (IVPSE) can be used to accelerate and widespread genetic gains throughout the swine industry, which would allow greater availability of a large number of embryos for xenotransplantation, transgenesis and cloning. The development of *in vitro* fertilization allows the understanding of basic events related to maturation and fertilization and the use of the zygotes for scientific studies focused on culture, creation of germoplasm banks and also for trading of genetic material. However, the difficulties currently observed in the IVPSE still deserve special attention, which makes imperative the development of routine research procedures in swine reproduction laboratories. This article is aimed at describing the distinct steps of the IVPSE, reviewing the physiological processes related to oocyte maturation and fertilization and emphasizing the potential impact of such technique on the swine industry.

Key words: *in vitro* production, swine, embryos

INTRODUÇÃO

A técnica de PIVES pode ser utilizada nos diferentes segmentos da reprodução assistida, tanto na área humana, como na área animal, permitindo um melhor entendimento dos fenômenos de crescimento, maturação e fecundação de oócitos, da capacitação espermática, bem como do desenvolvimento embrionário e seus mecanismos de regulação (GONÇALVES *et al.*, 2002).

Na espécie suína existem várias aplicações para a PIVES dentre as quais pode-se citar: incremento no progresso genético pelo melhoramento do potencial dos gametas femininos, ou do melhor uso dos reprodutores; a produção de

embriões de alto valor genético pela fecundação com espermatozoides sexados; a produção de embriões em estágios determinados para a transferência e congelamento, o estabelecimento de bancos de genes, (congelamento de gametas femininos e masculinos) e a redução do número de animais utilizados para experimentos (VISSCHER *et al.*, 2000). Além disso, os embriões produzidos podem ser implantados em fêmeas suínas receptoras, que carregam consigo a integridade genética que se deseja, tornando possível, selecionar geneticamente os melhores animais para a reprodução (VISSCHER *et al.*, 2000).

O interesse científico na PIVES começou devido à necessidade de aprofundamento sobre a capacidade fecundante dos reprodutores utilizados em inseminação artificial (IA) (DAY, 2000). A produção de embriões na espécie suína apresenta a particularidade de que os ovários desta espécie contém mais de 200.000 folículos primordiais (GRUPEN *et al.*, 1995), o que é vantajoso em comparação a espécie bovina que apresenta em torno de 150.000 folículos primordiais. O objetivo desta revisão foi descrever as diferentes etapas da PIVES, abordando os processos fisiológicos de maturação e fecundação de oócitos, e ressaltando o impacto desta biotécnica na cadeia produtiva da suinocultura.

Fisiologia Reprodutiva da Fêmea Suína

A fêmea suína apresenta em média 21 dias de ciclo estral. Em porcas, o estro (cio) tem uma duração média de 50-60 horas, podendo variar de 20 a 120 horas (BANKS, 1992). Em leitoas, esta fase dura aproximadamente 24-36 horas, podendo ser mais curta e altamente variável (ANDERSON, 1995). O início do estro está relacionado com uma queda nos níveis circulantes de progesterona e com o aumento nos níveis circulantes de estrogênio, produzido pelo folículo em crescimento (PRATHER & DAY, 1998).

Os ovários secretam seus próprios hormônios, principalmente esteróides (estrogênio e progesterona). O estrogênio é produzido no folículo ovariano em desenvolvimento, enquanto que a progesterona é produzida no corpo lúteo (ROBINSON & SHELTON, 1991).

A liberação máxima de estrogênio se dá antes da ovulação, quando o crescimento folicular está em seu ponto máximo, já a progesterona atinge seu ponto máximo de liberação quando ocorre à completa formação do corpo lúteo (SOEDE, *et al* 1995).

A ovulação é caracterizada pelo rompimento dos folículos, seguido da liberação dos oócitos, e pode ocorrer individualmente, em qualquer momento do estro, havendo grande variabilidade entre fêmeas (ANDERSON, 1995). As porcas ovulam, em média, entre 40 e 50 horas após o início do cio (SOEDE & KEMP, 1997), enquanto que as leitoas ovulam,

¹ PIGPEL - Centro de Biotecnologia - Faculdade de Veterinária
Universidade Federal de Pelotas
Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900
*e-mail : cqstonieto@yahoo.com.br

(Recebido para Publicação em 16/11/2004, Aprovado em 11/09/2007)

após 30 horas do início do cio (ALMEIDA *et al.*, 2000). Com isso, pode-se afirmar que a ovulação ocorre no início do terço final do estro, ou seja, depois de transcorridos 64 a 72% do mesmo (SOEDE & KEMP, 1997, SOEDE *et al.*, 1995).

É importante relatar também, que a fêmea suína produz um grande número de oócitos (10-30), e apresenta uma alta taxa de fecundação (95-100%). No entanto, em torno de 50% dos embriões são perdidos ao longo da gestação, sendo que 30 a 40 % ocorrem nos primeiros 30-40 dias, seguida de uma redução de 10% durante a fase fetal. A assincronia útero-embrião e o intervalo de tempo necessário para a ovulação de todos os folículos podem explicar estas perdas (BANKS, 1992; DECKERT & DEWEY 1994).

Entre a ovulação e a entrada dos embriões no corno uterino, transcorrem aproximadamente 48 horas (ANDERSON, 1995). A clivagem, que é a divisão dos embriões até o estágio de blastocisto, ocorre entre o sexto e o sétimo dias de prenhez em fêmeas suínas (PRATHER & DAY, 1998). A maior parte das perdas ocorrem na fase embrionária, período que se estende até aproximadamente o 35º dia de gestação e, portanto, deve-se ter cuidado com a matriz suína, pois é nesta fase que ocorrem a fecundação, a migração e a implantação dos embriões no útero.

Procedimentos Envolvidos na PIVES

Capacitação espermática

A capacitação espermática foi descoberta por CHANG, em 1951, sendo descrita como a condição fisiológica necessária para que o espermatozóide se torne apto à fecundação. O espermatozóide é funcionalmente imaturo, enquanto permanece no testículo, somente adquirindo potencial fecundante durante o trânsito pelo epidídimo (KNOBIL & NEILL 1994).

Os espermatozóides, quando em contato com o plasma seminal, sofrem incorporações e modificações de várias substâncias de sua superfície que inibem o potencial fecundante dos mesmos. Este fenômeno bioquímico é denominado decapacitação espermática (RATH, 2001). Portanto, é fundamental a ocorrência da capacitação espermática (alterações na composição da membrana plasmática dos espermatozóides), ou seja, a retirada de uma camada glicoprotéica e de proteínas do plasma seminal que estão aderidas a membrana plasmática na região que sobrepõe a região do acrossoma (RATH, 2001).

A maior parte das mudanças que ocorrem no epidídimo está relacionada com a aquisição da motilidade e, em menor grau, com a morfologia e o metabolismo do espermatozóide (BAZER *et al.*, 1995). A maturação espermática é consequência de várias modificações bioquímicas do espermatozóide, tais como: estabilização da cromatina e das estruturas de cabeça e cauda, estabilização da membrana plasmática pela absorção e/ou integração de glicoproteínas epididimárias, aquisição de movimentos progressivos e habilidade de ligar-se à zona pelúcida (GONÇALVES *et al.*, 2002).

A capacitação espermática é efetivada pela remoção de fatores inibidores deste processo, derivados do plasma seminal e da interação das células espermáticas com os chamados "fatores capacitantes" que se encontram no trato genital feminino. A capacitação é desencadeada a partir da ejaculação no trato genital feminino e acredita-se que se inicie no útero, todavia, o principal local da capacitação parece ser a tuba especificamente, a região do istmo (RATH, 2001). A regulação hormonal é responsável pela ovulação e, em consequência, pelas modificações estruturais e bioquímicas do ambiente útero-tubário, que condicionam o transporte e a

viabilidade dos espermatozóides pelo trato genital feminino (RATH, 2001), permitindo a ativação acrossômica, para a penetração do espermatozóide no oócito (BAZER *et al.*, 1995).

Os eventos da capacitação resultam em desestabilização e fluidez da membrana plasmática e hiperativação espermática, essenciais para que ocorram a reação acrossômica e a penetração do espermatozóide no oócito. Alguns glicosaminoglicanos presentes no trato genital feminino são responsáveis pela indução da capacitação espermática *in vivo*. Nos processos *in vitro*, em bovinos, por exemplo, a heparina tem sido usada como o glicosaminoglicano na capacitação espermática (ANDERSON, 1991). Em suínos utiliza-se a cafeína na indução da capacitação espermática (MARTINEZ *et al.*, 1993).

Reação Acrossômica

Na presença de cálcio extracelular, o espermatozóide capacitado tem a habilidade de se ligar à zona pelúcida do oócito e sofrer a reação acrossômica (RA). Os espermatozóides capacitados com acrossoma intacto passam pelas células do *Cumulus oophorus*, mas são incapazes de passar a zona pelúcida. Antes de penetrar no oócito, o espermatozóide deve se fixar à superfície da zona pelúcida e efetuar a reação acrossômica. O processo envolve a quebra progressiva da membrana do espermatozóide e a fusão da membrana plasmática e outras membranas acrossomais da célula espermática. Conseqüentemente, ocorre a exposição da membrana interna do acrossoma e a liberação de enzimas tais como: pré-acrosina, acrosina e hialuronidase. Estas são importantes na penetração do espermatozóide no interior do oócito (ANDERSON, 1991). Em suínos, além das enzimas já citadas, há a participação de uma outra, que é liberada do acrossoma chamada de sulfatase (RATH, 2001).

O mecanismo pelo qual a reação acrossômica é induzida pela zona pelúcida é desconhecido. A maioria dos pesquisadores cogita que esta ocorra por consequência de sinais provenientes da zona pelúcida em resposta à adesão espermática em sua superfície. Esta interação é caracterizada por uma reação de receptores, os quais são glicoproteínas denominadas de ZP₃, ZP₂, e ZP₁ que são sintetizados por oócitos em maturação, envolvendo somente espermatozóides capacitados, sendo que esta interação também se baseia na especificidade da fecundação em mamíferos (COX, 1990).

Os fenômenos da capacitação espermática e da reação acrossômica estão totalmente relacionados, embora não se conheça totalmente seu mecanismo de ação. Sabe-se que a reação acrossômica é dependente da disponibilidade de cálcio, o que levou a conclusão que este inativa as ATPases da membrana (BERGER *et al.*, 1996).

Estas ATPases teriam a função de manter baixos os níveis intracelulares de sódio e cálcio, enquanto os níveis de potássio, seriam mantidos elevados, a fim de impedir a ocorrência prematura da reação acrossômica, antes da adesão dos gametas. A inativação das ATPases no momento da reação acrossômica promove um aumento intracelular de cálcio, que, por sua vez desencadeia um influxo de prótons, por intermediação dos níveis de Na⁺/H⁺. O influxo de íons H⁺ é acompanhado de um aumento do pH intracelular que ativa as enzimas acrossômicas (BERGER *et al.*, 1996).

Obtenção dos Oócitos

Os oócitos usados para PIVES podem oriundos de ovários de fêmeas pré-púberes abatidas em frigorífico. Os ovários são transportados em solução salina 0,9% acrescida de, por exemplo, 100 mg de sulfato de kanamicina, à temperatura de 30°C. Geralmente são puncionados folículos

ovarianos de 3 a 6 mm de diâmetro (XU *et al.*, 1996) A seleção dos oócitos é realizada com o auxílio de lupa estereomicroscópica. Posteriormente, são realizadas lavagens em solução salina de fosfato tamponada (PBS), acrescida de 0,4% de albumina sérica bovina (BSA). Após a aspiração folicular, o conteúdo resultante é deixado no banho-maria, por 10 minutos, onde os complexos *Cumulus oophorus* (CCO) sedimentam (XU *et al.*, 1996).

Células do *Cumulus oophorus*

As células do *Cumulus oophorus* circundam o oócito e estão metabolicamente ligadas umas as outras e aos oócitos promovendo a única ligação para a entrada de substâncias tais como proteínas, aminoácidos, enzimas, no ooplasma (DOWNS,1990).

As células do *cumulus oophorus* adjacentes à zona pelúcida possuem numerosas projeções que penetram na zona pelúcida. Nos oócitos imaturos, estas células terminam em invaginações no oolema. Neste local existem junções denominadas de junções *gap*. Concomitantemente com a maturação do oócito ocorre a expansão das células do *Cumulus oophorus*, que na maturação *in vitro* é observada entre 12 a 18 horas de cultivo (HYTTEL *et al.*, 1989).

Durante a maturação oocitária as junções *gap* entre as células do *Cumulus oophorus* são interrompidas. Como resultado disto e também pela deposição de ácido hialurônico entre as células do *Cumulus oophorus*, ocorre a ativação ou expansão das mesmas. Este fenômeno tem sido considerado como uma indicação da maturação citoplasmática, uma vez que somente oócitos com células do *Cumulus oophorus* ativadas podem ser fecundadas *in vitro*. A expansão das células do *Cumulus oophorus* tem sido mais efetiva quando oócitos suínos são maturados com a combinação de LH e FSH (DODE,1994).

Seleção e Maturação oocitária

O oócito considerado ideal para ser maturado é aquele que possui no mínimo três camadas de células do *Cumulus oophorus* compactadas, citoplasma de coloração homogênea e sem vacúolos (RATH, 2001).

O oócito, no interior do folículo, está envolto por células do *Cumulus oophorus*, formando o CCO. O conjunto de células próximo da zona pelúcida, que estão em íntimo contato com o oócito por junções intercomunicantes é denominado de *corona radiata*. Substâncias reguladoras produzidas pelo oócito têm função importante na atividade das células do *Cumulus oophorus* e, da mesma maneira, componentes dessas células tem participação ativa no crescimento e maturação dos oócitos (BAZER *et al.*, 1995).

Características macroscópicas do folículo são importantes para determinar o potencial de maturação nuclear e citoplasmática do oócito. Em suínos a aquisição da competência meiótica está relacionada com a formação de um nucléolo compacto. Todos os oócitos obtidos de folículos com 1,7 a 2,2 mm de diâmetro possuem nucléolo compacto e 100% destes sofrem a quebra da vesícula germinal em 24 horas de cultivo (MOTLIK,1989).

A maturação envolve mudanças nucleares e citoplasmáticas no oócito, assim como nas células do *Cumulus oophorus*. O oócito imaturo se encontra parado no estágio de prófase da primeira divisão meiótica. A maturação nuclear inicia-se com a retomada da meiose pela quebra do envelope da vesícula germinal, atingindo o estágio de metáfase I (RATH, 2001). A completa maturação nuclear ocorre entre 20 e 24 horas e é marcada pela expulsão do primeiro corpúsculo polar e formação da segunda placa

metafásica. Paralelamente à maturação nuclear ocorrem eventos citoplasmáticos no oócito caracterizados pela síntese de proteínas, migração e reorganização de organelas que fornecem ao oócito a capacidade de ser fecundado e de se desenvolver normalmente (XU & KING, 1990; DODE, 1994). Enquanto as mitocôndrias tendem a migrar para o centro do oócito, os grânulos corticais se deslocam em sentido contrário. As células do *Cumulus oophorus*, que no oócito primário se apresentam em multicamadas compactas, sofrem expansão durante a maturação e perdem as comunicações intercelulares com o oócito (SZOLLOSI, 1991). O oócito secundário fica parado em metáfase II, até que ocorra sua ativação que, em condições normais, ocorre pela penetração espermática.

Fecundação e Cultivo *in vitro*

A fecundação representa o ponto culminante de todos os eventos iniciados pela penetração do espermatozóide pelas diferentes membranas celulares e acelulares que rodeiam o oócito, resultando na formação dos pro-núcleos feminino e masculino. A penetração do oócito pelo espermatozóide resulta em uma série de eventos que conduzem ao desenvolvimento do embrião. A resposta do oócito ao contato com o espermatozóide inclui modificações nos grânulos corticais e no citoesqueleto, a iniciação da segunda divisão meiótica e vários processos de biossíntese (XU & KING, 1990).

Na maioria dos mamíferos, ocorre a formação de barreiras que previnem a fecundação por mais de um espermatozóide. Estão incluídos neste fenômeno a reação da zona pelúcida e o bloqueio vitelínico. Quando as condições de maturação são inadequadas, a interação espermatozóide-oócito fica prejudicada, ocorrendo a formação tardia e irregular dos grânulos corticais, o que ocasiona altas taxas de polispermia (RATH, 2001). Para evitar que ocorra a polispermia *in vitro*, é necessário reduzir a quantidade de espermatozóide durante a fecundação (RATH, 1992).

No momento da penetração espermática, na maioria das espécies, com exceção do cão, o oócito está em metáfase II. Quando o espermatozóide penetra no oócito, ocorre a ativação do mesmo, e a finalização da segunda divisão meiótica, passando por anáfase, telófase e expulsão do segundo corpúsculo polar (ANDERSON, 1991; CROZET, 1991).

Um fator limitante para o cultivo dos embriões suínos, é o desenvolvimento até o estágio de quatro células. Considera-se que este fato ocorra por condições inadequadas de cultivo, e que coincida com o tempo das primeiras ativações do genoma embrionário. Segundo RATH (2001) existem critérios para a avaliação dos embriões suínos após a fecundação *in vitro*, tais como: estado de desenvolvimento; integridade da zona pelúcida; presença de espermatozóides aderidos à zona pelúcida; delimitação e uniformidade dos blastômeros; e presença do espaço perivitelinio.

O meio utilizado na fecundação *in vitro*, e que apresenta melhores resultados, é o TCM 199 acrescido de 10% soro fetal bovino e 5 mmol de cafeína, utilizando sêmen fresco, com taxas de fecundação de 94% (FUNAHASHI & DAY, 1993). CORDOVA *et al.* (1997), usando Talp acrescido 0,6% de BSA (albumina sérica bovina), obtiveram, também com sêmen fresco, uma taxa de fecundação de 71-100%. No entanto, ABEYDEERA *et al.* (1999) ao comparar a capacidade de desenvolvimento embrionário em dois diferentes meios de cultivo, (NCSU e Meio Whitten's modificado mWM), observaram taxas de desenvolvimento embrionário de 30% para o meio NCSU e de 5% para o meio mWM. Estes autores afirmam que há uma diferença entre os dois meios, pois no

meio mWM existe uma concentração alta de lactato de sódio (25 mmol), o que proporcionaria um decréscimo na produção de embriões durante o desenvolvimento embrionário. Dessa forma, o NCSU é considerado um meio com bom desempenho para o desenvolvimento de embriões suínos.

Limitações da técnica de produção *in vitro* de embriões suínos

Na PIVES, em suínos, a capacidade de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, é muito baixa, assim como a dificuldade na obtenção da maturação citoplasmática dos oócitos, a alta taxa de polispermia e a baixa eficiência no cultivo embrionário (RATH, 2001).

A maturação citoplasmática de oócitos suínos é uma etapa delicada, pois a partir desta, o oócito adquire competência para o posterior desenvolvimento embrionário. A utilização de meios simples na maturação de embriões suínos pode ser considerada como a causa principal para os baixos níveis de desenvolvimento embrionário (FUNAHASHI *et al.*, 1994). Atualmente, sabe-se que é necessário diminuir a concentração de cloreto de sódio (FUNAHASHI *et al.*, 1994) ou suplementar os meios com cisteína (GRUPEN *et al.*, 1995), para que as taxas de desenvolvimento embrionário melhorem significativamente.

A polispermia é outro fator limitante, que resulta em falhas no desenvolvimento embrionário (HUNTER, 1996). Acredita-se que o meio *Tris-buffered*, utilizado no processo de capacitação espermática *in vitro*, cause perdas de alguns constituintes da membrana plasmática, e conseqüentemente, modificando a arquitetura lipídica da mesma, ocasionando perdas no desenvolvimento embrionário (ASHWORTH *et al.*, 1995).

Para melhorar a eficiência deste procedimento, é possível controlar as condições do meio no qual ocorre a fecundação, diminuindo as taxas de polispermia. FUNAHASHI & DAY (1993), utilizando o meio de fecundação TCM 199 com 0,4% de BSA, obtiveram redução nas taxas de polispermia de 63% para 46%. Segundo RATH (1992), as altas taxas de polispermia estão relacionadas com a dose inseminante durante a fecundação *in vitro*. Portanto, se a dose inseminante for baixa, as taxas de polispermia tendem a diminuir. Porém, esta consideração deve ser revista, pois a redução da dose inseminante teria como conseqüência uma redução no número de espermatozoides em condições de penetrar no oócito, o que poderia afetar negativamente as taxas de fecundação (RATH, 1992).

Aplicações e perspectivas na cadeia produtiva da suinocultura

A suinocultura brasileira vem se destacando no cenário internacional pelos elevados índices de produtividade, ocorrendo paralelamente, um marcante crescimento no uso da inseminação artificial em granjas de suínos (DESCHAMPS *et al.*, 1998). Com o conseqüente aumento no volume de produção das centrais que comercializam sêmen, em função de benefícios sanitários, genéticos e econômicos, vem ocorrendo uma crescente tecnificação da suinocultura, desta forma, a IA consolidou-se como um importante instrumento capaz de auxiliar o produtor e a agroindústria a colocarem no mercado produtos cada vez mais qualificados e saudáveis (ALMOND *et al.*, 1998; ALTHOUSE *et al.*, 1998; DESCHAMPS *et al.*, 1998).

Com a PIVES, seria possível testar *in vitro* a habilidade fecundante dos animais utilizados na IA (BAVISTER, 1990),

permitindo avaliar de forma mais precisa, todas as etapas de ligação e penetração do espermatozóide à zona pelúcida, permitindo uma completa informação de todos os estágios da penetração espermática (MARTINEZ *et al.*, 1993). Assim, seria possível selecionar machos com maior potencial para formação de embriões e, conseqüentemente, produção de leitegadas de maior tamanho, índice este de desempenho reprodutivo que não é estimado com precisão pelos métodos convencionais de avaliação de sêmen, tais como motilidade, vigor e morfologia espermática (XU *et al.*, 1998).

Desta forma, os embriões desenvolvidos a partir da PIVES poderiam ser transferidos para fêmeas sexualmente maduras de alta capacidade reprodutiva e os animais produzidos poderiam ser vendidos para granjas comerciais (VISSCHER *et al.*, 2000). Com isso, ocorreria uma diminuição do atraso genético entre granjas núcleo e granjas comerciais, permitindo o estabelecimento de bancos de genes com o congelamento de gametas femininos.

CONCLUSÕES

Atualmente, apesar de vários estudos já terem sido realizados, a PIVES, ainda necessita ser aperfeiçoada, em especial quanto a redução na taxa de polispermia e ao desenvolvimento de eficiente método de cultivo *in vitro*.

Na espécie suína, o uso da PIVES não seria justificado pela busca de eficiência reprodutiva, mas sim, pelo possível desenvolvimento de uma fonte produtora de embriões com custo inferior ao de embriões produzidos *in vivo*. Estes embriões poderiam ser utilizados para o congelamento e para estudos básicos sobre os mecanismos de fecundação. Talvez o maior benefício que a PIVES possa oferecer à ciência, seria o fornecimento de embriões para estudos de transgênese, clonagem ou xenotransplantes e na produção de animais resistentes a determinadas doenças.

Porém, é importante considerar as dificuldades na obtenção de embriões produzidos *in vitro*, o que faz necessário a implantação desta técnica como rotina em laboratórios, além do desenvolvimento de mais pesquisas direcionadas à vitrificação de gametas e embriões, proporcionando o estabelecimento de bancos de genes, e o aumento da viabilidade dos embriões produzidos *in vitro*. Além disso, a criopreservação de embriões desempenharia um papel fundamental em termos de biossegurança, permitindo a introdução de genótipos superiores em rebanhos sanitariamente fechados, controlando a disseminação de doenças.

REFERÊNCIAS

- ABEYDEERA L.R.; PRATHER, R.S.; DAY, B.N. Developmental ability of *in vitro* derived pig embryos in four different culture media. **Biology of Reproduction**, Champaign, Supp. 60, p.128. 1999.
- ALMEIDA, F.R.C.L.; NOVAK, S.; FOXCROFT, G.R. The time of ovulation in relation to estrus duration in gilts. **Theriogenology**, Stoneham, v. 53, p.1389-1369. 2000.
- ALMOND, G.W.; BRITT, J.; FLOWERS, B.W.L.; GLOSSOP, C.; LEVIS, D.; MORROW, M.; SEE, T. **The swine AI book**. 2.ed. North Carolina: Ed. Ruth Cronje; North Carolina State University., 1998.
- ALTHOUSE, G.C.; WILSON, M.E.; KUSTER, C.; PARSLEY, M. Characterization of lower temperatures storage limitations of fresh-extended porcine semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 50, p. 535-543. 1998.

- ANDERSON, G.B. Fertilization, early development and embryo transfer. In: CUPPS, P. **Reproduction in Domestic Animals**. 4.ed. San Diego : Academic Press,1991. p.279-313.
- ANDERSON, L.L. Suínos In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 6.ed. São Paulo : Editora Manole, 1995. p 348-364.
- ASHWORTH, P.J.C.; HARRISON, R.A.P.; MILLER, N.G.A.; PLUMMER, J.M.; WATSON, P.F. Flow cytometric detection of bicarbonate induced changes in lectin binding in boar and ram sperm populations. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 40, p. 164-176, 1995.
- BANKS, W.J. Sistema reprodutor feminino. In: **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo :: Editora Manole, 1992. p. 567-577.
- BAVISTER, B.D. Test of sperm fertilizing ability. In: ASCH, R.H.; BALMACEDA, J.P.; JOHNSTON, I. (Ed.) **Serono Symposia-USA, Gamete Physiology**. Boston, 1990. p. 77-105.
- BAZER, F.W.; GEISERTE, R.D.; ZAVY, M.T. Fertilização, Clivagem e Implantação. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 6.ed. São Paulo : Editora Manole, 1995. p. 191-200
- BERGER, T.; ANDERSON, D. L.; PENEDO, M. C.T. Porcine sperm fertilizing potencial in relationship to sperm functional capacities. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 44, p. 231-239, 1996.
- CORDOVA, A.; DUCOLOMB, Y.; JIMENEZ, I.; CASAS, E.; BONILLA, E.; BETANCOURT, M. *In vitro* fertilizing capacity of frozen-thawed boar semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 47 p. 1309-1317 .1997.
- COX, J.F. Capacitacion espermatica para fertilizacion *in vitro* en ruminantes. Aspectos básicos y aplicados. Third symposium on advanced topics in animal reproduction. **Proceedings**, Jaboticabal- SP, p. 27-61, 1990.
- CROZET, N. La fecundation *in vitro*. In: THIBAUT, C & LEASEUR. M.C. **La Reproduction chez les mammiferes et l home INRA**. New York ,1991. p. 315-337
- DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N.; LUCIA, T. Jr. Impacto da inseminação artificial em suínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo horizonte, v. 22, p. 75-79,1998.
- DECKERT, A.; DEWEY, C. The influence of ovulation rate, early embryonic death, and uterine capacity on litter size in swine. **Compend. Continuing Educ. Pract. Vet.**, v.16. p.1237-1244, 1994.
- DODE, M.A.N. **Factors Influencing *in vitro* maturation of pig oocytes**. Thesis Urbana Champaign, Universty of Illionois, 1994. 137 p.
- DOWNS, S.M. The maintenance of meiotic arrest in mammalian oocytes. In: BAVISTER, B.D., CUMMINS, J; ROLDAN, E.R. **Fertilization mammals. Serono Symposia**, Chicago,1990. p. 5-16
- FUNAHASHI, H.; DAY, B.N. Effects of follicular fluid at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig oocytes . **Journal of Reproduction and Fertility**, Amsterdam, v. 99 p. 97-103, 1993.
- FUNAHASHI, H.; STUMPF, T.T.; TERLOUW, S.L.; CANTLEY, T.C.; RIEKE, A, DAY, B.N. Development ability of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. **Theriogenology** , Stoneham, v. 41, p. 1425-1433, 1994.
- GONÇALVES, P.B.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.; MANTAGNER, M.M.; COSTA, L.F. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P.B., FIGUEIREDO, J.R., FREITAS, V.J **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. p. 195-226.
- GRUPEN, C.G.; NAGASHIMA, H.; NOTTLE, M.B. Cysteamine enhances *in vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 53, p. 173-178, 1995.
- HUNTER, R.H.F. Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of fertilization to avoid polyspermy. **Molecular Reproduction and Development** , New York, v. 44, p. 417-422, 1996.
- HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, Amsterdam, Supl. 38. p. 35-47, 1989.
- KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The physiology of reproduction**. 2.ed. New York : Raven Press, 1994. p. 190.
- MARTÍNEZ, E.; VÁSQUEZ, J. M.; MATAS, C.; ROCA, J.; COY, P., GADEA, J. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. **Theriogenology**, Stoneham, v. 40, p. 547-557, 1993.
- MOTLIK, J. Cytoplasmatic aspects of oocyte growth and maturation in mammals. **Journal of Reproduction and Fertility**, Champaign, v. 38. Suppl. p. 17-25, 1989.
- PRATHER, R.S.; DAY, B. N. Practical considerations for the *in vitro* production of pig embryos. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, p.23-32, 1998.
- RATH, D. Experiments to improve *in vitro* fertilization techniques for *in vivo* matured porcine oocytes. **Theriogenology**, Stoneham, v. 37, p. 885-896, 1992.
- RATH, D. Producción *in vitro* de embriones porcinos. In: PALMA, G.A. **Biología de la Reproducción**. Argentina, 2001. p. 651 –652.
- ROBINSON, T.J.; SHELTON, J.N. Reproduction in cattle. In: CUPPS, P.T. **Reproduction in domestic animals**. 4 ed. San Diego: Academic Press. 1991. p. 445-470.
- SOEDE, N.M.; KEMP, B. Expression of oestrus and timing of ovulation in pigs. Control of Pig Reproduction. **Journal of Reproduction and Fertility**, Champaign, Supp. 52: v. p. 91-103. 1997.
- SOEDE, N.M.; WETZELS, C.C.H.; ZONDAG, W.; HAZEKEGER, W.; KEMP, B. Effects of a second insemination after ovulation on fertilization rate and accessory sperm count in sows. **Journal of Reproduction and Fertility**, Champaign, v. 105. p. 135-140, 1995.
- SZOLLOSI, D. Maturation de l Ovocyte. In: THIBAUT. C.; LEVASSERUR. M.C. **La reproduction ches lés mammíferes et l homme**. New York : 1991. p. 299-314.
- VISSCHER, P.; PON-WONG, R.j; WHITTEMORE, C.; HALEY, C. Impact of biotechnology on cross breeding programmes in pigs. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 65, p.57-70, 2000.
- XU, K.P.; KING, W.A The biology of mammalian fertilization and embryo development. **Biotech. News and Information** v. 21, p. 25-28,1990.
- XU, X.; SETH, P.C.; HARBISON, D.S.; CHEUNG, A.P.; FOXCROFT, G.R. Semen dilution for assessment of boar ejaculate quality in pig IVM and IVF systems. **Theriogenology**. Stoneham, v. 46, p. 1325-1337, 1996.
- XU, X.; POMMIER, S.; ARBOV, T.; HUTCHINGS, B.; SOTTI, W.; FOXCROFT, G. R. *In vitro* maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.76, p.3079-3089, 1998.