

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Método de maturação ovocitária e cultivo embrionário bovino sob agitação 3D (por
inclinação) lenta

Victor Henrique Lopes de Araújo

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biotecnologia,
da Universidade Federal de Uberlândia
para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia

2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Método de maturação ovocitária e cultivo embrionário bovino sob agitação 3D (por
inclinação) lenta

Victor Henrique Lopes de Araújo

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti
Doutoranda Elusca Helena Muniz

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biotecnologia,
da Universidade Federal de Uberlândia
para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia

2026



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Curso de Graduação em Biotecnologia -
Uberlândia

Av. Pará, 1720, Bloco 2E, Sala 205 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34)3225-8441 - www.ibtec.ufu.br - cbiotec@ibtec.ufu.br



ATA DE DEFESA - GRADUAÇÃO

Curso de Graduação em:	Biotecnologia				
Defesa de:	Trabalho de conclusão de curso II - GBT094				
Data:	20/03/2026	Hora de início:	09:00	Hora de encerramento:	10:02
Matrícula do Discente:	12211BTC007				
Nome do Discente:	Victor Henrique Lopes de Araújo				
Título do Trabalho:	Método de maturação ovocitária e cultivo embrionário bovino sob agitação 3D (por inclinação) lenta				
A carga horária curricular foi cumprida integralmente?		(x) Sim () Não			

Reuniu-se na Sala 223, bloco 4K, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Curso de Graduação em Biotecnologia, assim composta: Profa. Dra. Vivian Alonso Goulart - IBTEC/UFU; Lucas Jaeger Kluge; Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti - ICBIM/UFU, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa, Dr. Marcelo Emílio Beletti, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao discente a palavra, para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do curso.

A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o candidato:

(X) Aprovado Nota [100] (Somente números inteiros)

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Emílio Beletti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 20/03/2026, às 10:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade de realizar esta graduação e pela vida de todas as pessoas que tornaram possível a conclusão desta etapa.

Agradeço aos meus pais, que sempre me apoiaram e não mediram esforços para que eu pudesse estudar em outra cidade e realizar este sonho, além de me auxiliarem e me aconselharem nos momentos difíceis e estarem presentes nos momentos alegres. Essa conquista também é deles e nada disso seria possível sem o carinho e o apoio que sempre me ofereceram.

Agradeço à minha família que, mesmo devido à distância e à minha ausência em alguns momentos, nunca me deixou desistir e sempre manifestou apoio e amor por mim.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, que me deu a oportunidade de compor a equipe do Laboratório de Biologia da Reprodução e seguir o meu sonho de trabalhar com melhoramento genético animal.

À minha coorientadora, Doutoranda Elusca Helena Muniz, que, além de cumprir o papel acadêmico, também foi uma amiga, conselheira e psicóloga durante toda essa trajetória, auxiliando-me para além da vida de laboratório.

Aos meus amigos Gabriela, Augusto, Mariana, Victória, Letícia e Thomas por estarem presentes em todos os momentos da minha graduação, criarem memórias inesquecíveis e descobrirem junto comigo o que é ser verdadeiramente adulto.

Aos meus amigos da turma B26, que dividiram as experiências doces e amargas da graduação e tornaram o dia a dia de aulas sempre mais leve.

À Bateria Incendiária, que foi um porto seguro durante essa trajetória e me fez encontrar alegria, distração, conforto e muitas amizades em meio a um único objetivo comum: a música. Desenvolvi habilidades e evolui muito como pessoa ao fazer parte dessa família.

À Bateria Ufutura, que expandiu os meus horizontes e me possibilitou participar de desafios que nunca imaginei que conseguiria enfrentar, além de vivenciar experiências incríveis.

Por fim, agradeço à toda a equipe do Laboratório de Biologia da Reprodução da UFU, que me ensinou e aprendeu junto comigo como desenvolver uma melhor postura como aluno e pesquisador, mas, sobretudo, como me tornar um ser humano melhor.

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma técnica que revolucionou o nicho de reprodução bovina ao possibilitar a escolha e a disseminação de material genético de interesse para ampliar a eficiência reprodutiva e zootécnica do rebanho. Entretanto, algumas etapas deste processo como a maturação ovocitária *in vitro* (MIV) e o cultivo embrionário *in vitro* (CIV) ainda apresentam limitações, as quais implicam em baixas taxas de blastocistos comercializáveis produzidos. Dessa forma, investigou-se neste trabalho a utilização do método de agitação 3D lenta por inclinação como alternativa para mimetizar o ambiente fisiológico da tuba uterina com o objetivo de ampliar a eficiência da PIVE. Para tanto, foi avaliado o regime de agitação contínua em variados grupos de estudo, e comparados a grupos controles, para investigar o impacto desta metodologia sobre as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário e de formação de blastocistos. As taxas de clivagem não apresentaram diferenças significativas entre os protocolos, indicando que o estímulo mecânico durante a maturação *in vitro* não interfere na quantidade inicial de embriões produzidos. Contudo, o desenvolvimento embrionário e, consequentemente, a formação de blastocistos foram afetados negativamente, evidenciando que o cultivo *in vitro* é uma etapa mais sensível e suscetível a variações do ambiente. Os resultados demonstraram que a agitação 3D lenta por inclinação, embora seja uma alternativa promissora devido à simplicidade, ao baixo custo e à fácil aplicação, ainda requer ajustes no estímulo mecânico empregado.

Palavras-chave: Produção *in vitro* de embriões; MIV; CIV; agitação 3D; biotecnologia reprodutiva.

ABSTRACT

In vitro embryo production (IVEP) is a technique that has revolutionized the bovine reproduction niche by enabling the selection and dissemination of genetic material of interest to improve herd reproductive and zootechnical efficiency. However, some stages of this process, such as *in vitro* oocyte maturation (IVM) and *in vitro* embryo culture (IVC), still present limitations, resulting in low rates of marketable blastocysts. Therefore, this study investigated the use of the 3D slow agitation method by tilting as an alternative to mimic the physiological environment of the fallopian tube in order to increase the efficiency of IVP. To this end, the continuous agitation regime was evaluated in various study groups and compared to control groups to investigate the impact of this methodology on cleavage rates, embryonic development, and blastocyst formation. Cleavage rates did not show significant differences between protocols, indicating that mechanical stimulation during *in vitro* maturation does not interfere with the initial number of embryos produced. However, embryonic development and, consequently, blastocyst formation were negatively affected, demonstrating that *in vitro* culture is a more sensitive stage and susceptible to environmental variations. The results showed that slow 3D tilting agitation, although a promising alternative due to its simplicity, low cost, and ease of application, still requires adjustments to the mechanical stimulus employed.

Keywords: *In vitro* embryo production; oocyte maturation; embryo culture; 3D agitation; reproductive biotechnology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. OBJETIVOS	5
3. METODOLOGIA.....	9
4. RESULTADOS	16
5. DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÃO.....	27
7.REFERÊNCIAS.....	28

1. INTRODUÇÃO

A agropecuária detém um papel de destaque na economia e na segurança alimentar mundial, uma vez que esta atividade impacta diversos setores que vão desde a produção primária até o processamento e a comercialização de inúmeros insumos. No cenário brasileiro, a bovinocultura assume um papel central na produção agropecuária global, constituindo-se como uma das principais atividades econômicas do país e contribuindo significativamente para o Produto Interno Bruto (PIB) do setor. À medida que as demandas globais por proteína animal aumentam, observa-se uma maior pressão e exigência sobre esse mercado, além da eficiência e da produtividade dos rebanhos serem impulsionadas pelo avanço das tecnologias reprodutivas. Entre essas inovações, a Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE) destaca-se como uma biotecnologia essencial (PONTES et al., 2009), permitindo a multiplicação acelerada de animais geneticamente superiores e o aprimoramento contínuo da qualidade do plantel nacional (BATISTELA; PEREIRA; NASCIMENTO; DIAS, 2023).

1.1 Funcionamento da PIVE

A PIVE é composta por quatro etapas interdependentes: A maturação ovocitária *in vitro* (MIV), a fertilização *in vitro* (FIV), o cultivo embrionário *in vitro* (CIV) e, por fim, a transferência dos embriões (TE) ao útero de fêmeas receptoras. A primeira etapa corresponde à maturação de ovócitos imaturos, chamados de complexos cumulus-ovócito (CCOs), que são cultivados para adquirir competência para a fertilização. Em seguida, a fertilização *in vitro* permite que os gametas masculinos e femininos sejam colocados em contato para a formação do zigoto, dependendo diretamente da integridade da cromatina espermática (ROCHA et al., 2025). A terceira etapa refere-se ao cultivo embrionário *in vitro*, fase na qual os zigotos se desenvolvem até o estágio de blastocisto em condições laboratoriais controladas. Por fim, ocorre a transferência de embriões para o útero de fêmeas receptoras devidamente preparadas (MACIEL; MASQUIO; TEIXEIRA, 2025).

Nesse contexto, a etapa de MIV é crucial para garantir que os ovócitos estejam aptos para serem fertilizados e se desenvolvam em embriões viáveis. Durante a maturação *in vitro*, os ovócitos passam por diversas transformações nucleares e citoplasmáticas importantes, como

a conclusão da meiose, a reorganização do citoesqueleto, o acúmulo de reservas energéticas e a ativação de vias de sinalização celular fundamentais para o sucesso da fecundação e do desenvolvimento embrionário. Além disso, o sucesso desta etapa é influenciado por fatores externos, como o intervalo entre a estimulação hormonal e a aspiração folicular (SIRARD et al., 2012), e pode ser potencializado pela suplementação do meio com substâncias como beta-NGF (MARTINS et al., 2025) ou antioxidantes como melatonina e coenzima Q10 (RUIZ-CONCA et al., 2023).

Na sequência, o cultivo embrionário também é uma etapa determinante ao proporcionar um ambiente ideal que simule as condições naturais para o desenvolvimento dos zigotos até o estágio de blastocisto. Durante o CIV, ocorrem mudanças biológicas complexas, incluindo a ativação do genoma embrionário, a compactação dos blastômeros e a diferenciação celular entre a massa celular interna e a trofoectoderme (BAE, 2011). O sucesso desta fase depende da manutenção de um microambiente que sustente a expressão de genes associados à viabilidade e que preserve a integridade epigenética, garantindo que o embrião possua competência para a implantação e o desenvolvimento gestacional pleno (SWAILI; SHELLING, 2009; SANTOS et al., 2023).

1.2 Limitações da MIV e CIV no modelo tradicional

Apesar dos avanços, a PIVE ainda enfrenta limitações significativas, uma vez que as taxas de conversão de ovócitos em blastocistos encontram-se relativamente baixas, variando entre 30% e 45%, de modo que parte considerável dos embriões apresentam defeitos morfológicos ou epigenéticos, os quais inviabilizam a transferência e uma gestação bem sucedida. Essa realidade indica que a produção de embriões no ambiente *in vitro*, ainda que permita o aumento da quantidade de células resultantes, apresenta qualidade inferior àqueles *in vivo* (KIM et al., 2025).

Nesse sentido, o cultivo tradicional de embriões é comumente realizado em sistemas bidimensionais (2D), nos quais os CCOs são expostos em superfícies plásticas (placas de Petri ou placas de cultura de plástico tratadas). Contudo, esse método induz a adesão dos CCOs ao substrato, o que provoca o achatamento destes, além de afetar a comunicação entre as células envolvidas e poder comprometer a maturação completa dos ovócitos (KOO et al., 2024). Além disso, o ambiente estático impede a dispersão eficiente de resíduos metabólicos, o que pode

levar a alterações na metilação global e comprometer a competência embrionária (MIMURA et al., 2023).

1.3 Alternativas e o uso de agitação 3D

Uma alternativa para esse cenário é a utilização de métodos tridimensionais (3D) de cultivo, que almejam recriar a tridimensionalidade do ambiente uterino e propiciar condições fisiológicas mais fiéis para o desenvolvimento dos gametas e embriões.

Dessa forma, dentro da busca por maior fidelidade fisiológica, diferentes biotecnologias estão em processo de pesquisa para aprimorar a MIV e o CIV. Dentre os métodos mais recentes e estudados destacam-se: o uso de plasma rico em plaquetas (PRP) como substituto ao soro fetal bovino (SFB); e a aplicação de sistemas microfluídicos e matrizes 3D baseadas em hidrogéis, que são ferramentas capazes de influenciar positivamente a expressão gênica embrionária (RUIZ-CONCA et al., 2023; ZHANG et al., 2024); bem como a aplicação de sistemas de agitação leve, como a microvibração ou o modelo de inclinação (*tilting*), que visam promover uma suspensão homogênea das células, facilitando a troca de nutrientes e evitando o acúmulo de subprodutos citotóxicos (MIZOBE et al., 2011; YAMANAKA et al., 2010).

Entretanto, apesar de promissores, muitos desses métodos demandam equipamentos sofisticados ou possuem limitação de aplicação prática em larga escala.

Nesse sentido, o modelo de agitação 3D empregado neste presente estudo surge como uma abordagem alternativa de fácil implementação e baixo custo. Esse método consiste na utilização de um agitador KASVI modelo K45-4020, agitador Basic 3D, velocidade 20 Rpm, 220V que gera a movimentação inclinada de tubos de cultura em baixa velocidade e de maneira constante para promover uma suspensão homogênea dos CCOs e embriões no meio de cultura. Tal estratégia visa mimetizar as condições do ambiente uterino, uma vez que no contexto natural os ovócitos e embriões são constantemente mobilizados pelas contrações musculares e pelo batimento ciliar das tubas.

Nessa perspectiva, este estudo investigou a utilização da agitação 3D suave durante a MIV e o CIV sob dois modelos: o uso dessa metodologia tanto na maturação quanto no cultivo embrionário e a utilização do agitador apenas durante o período de CIV. Assim, a avaliação desse método foi efetuada a partir da comparação da taxa de clivagem, taxa de desenvolvimento embrionário e taxa de blastocistos com as respectivas taxas do modelo tradicional (controle).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Validar o método de maturação ovocitária e cultivo embrionário bovino sob agitação 3D (por inclinação) lenta para aumento da quantidade dos embriões comercializáveis produzidos.

2.2 Objetivos específicos

- Testar método de maturação ovocitária e cultivo embrionário sob agitação 3D (por inclinação) lenta de forma contínua.
- Testar apenas o método de cultivo embrionário sob agitação 3D (por inclinação) lenta de forma contínua, sem aplicar a agitação durante a maturação ovocitária.

3. METODOLOGIA

3.1 Delineamento experimental

Para a realização deste trabalho, foram realizadas 16 rotinas diferentes de PIVE, divididas e avaliadas em 2 diferentes grupos. Grupo 1: aplicação de agitação 3D lenta de forma contínua durante a maturação e o cultivo embrionário. Foram feitas 8 rotinas sob este modelo com duração de uma semana cada (tempo referente ao processo de execução da PIVE). Grupo 2: aplicação de agitação 3D lenta de forma contínua apenas durante o cultivo embrionário. Foram produzidas também 8 rotinas utilizando a agitação apenas no CIV com a mesma duração de execução do grupo anterior. Além disso, cada rotina contou com um respectivo Grupo Controle (ausência de agitação e apoio), que passou pelas mesmas etapas da PIVE. Para a análise estatística, foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados possuíam distribuição normal. Como em cada rotina de PIVE existiam o grupo experimental e o grupo controle, foi utilizado o teste t pareado, para verificar a existência de diferenças entre os grupos, minimizando a influência das variáveis não controladas, tais como, a quantidade de CCOs obtidas na dada semana de execução, a palheta de sêmen utilizada para fertilização, entre outros fatores que não são constantes para todas as rotinas.

3.2 Produção *in vitro* de embriões

Para a realização deste estudo, foram utilizados ovários bovinos doados por frigoríficos na região de Uberlândia para fins de pesquisa, bem como doses de sêmen congelado adquiridas de empresas especializadas. Ademais, todos os meios de cultura utilizados para a execução das etapas de PIVE foram adquiridos da empresa especializada Vitrogen. Também foi utilizado um agitador para tubos 3D com rotação de 20 rpm durante as fases de maturação e cultivo embrionário, bem como 2 suportes para os tubos manufaturados pela equipe do Laboratório de Biologia da Reprodução ICBIM/UFU. Além disso, todas as etapas estiveram sob controle e vigilância biológica para evitar contaminação e comprometimento do estudo.

As PIVEs foram realizadas segundo a metodologia descrita a seguir:

3.2.1 Obtenção e seleção dos ovócitos

Os ovários foram coletados *post mortem* em abatedouros comerciais das cidades de Uberlândia e Araguari, e foram transportados em garrafas térmicas até o laboratório de Biologia da Reprodução (ICBIM/UFU) em Uberlândia. Após a chegada ao laboratório, os ovários foram

mantidos em banho-maria a 37°C para efetuar a aspiração folicular. Os folículos antrais ovarianos foram aspirados utilizando seringas de 5 mL e agulha 18G e o fluido aspirado foi transferido para tubos Falcon de 50 mL para a sedimentação, durante 20 minutos. Por fim, o sedimento foi depositado em placas de Petri de poliestireno de 90 x 15 mm e o rastreamento dos complexos cumulus-ovócito (CCOs), constituídos do ovócito e as células foliculares que o circundam, foi realizado com auxílio de micropipetas e microscópio estereoscópico.

Foram selecionados CCOs classificados como grau I e grau II segundo a metodologia proposta por STOJKOVIC et al, 2001. Dessa forma, consideraram-se CCOs de grau I aqueles que apresentaram ovócito com citoplasma homogêneo, ausência de vacúolos e células do cumulus rodeando todo o ovócito com três ou mais camadas de células. CCOs de grau II, aqueles que possuíam ovócitos com citoplasma ainda homogêneo, porém com pequenas irregularidades ou pigmentações, e três ou mais camadas de células do cumulus menos compactas. Os CCOs encontrados classificados como grau III (citoplasma heterogêneo e menor número de camadas de células do cumulus) e grau IV (citoplasma heterogêneo e células do cumulus ausentes, expandidas ou muito reduzidas) não foram selecionados. A morfologia teórica dos CCOs selecionados pode ser observada na figura 1 e as células encontradas durante a aspiração folicular nas rotinas de PIVE estão representadas na figura 2.

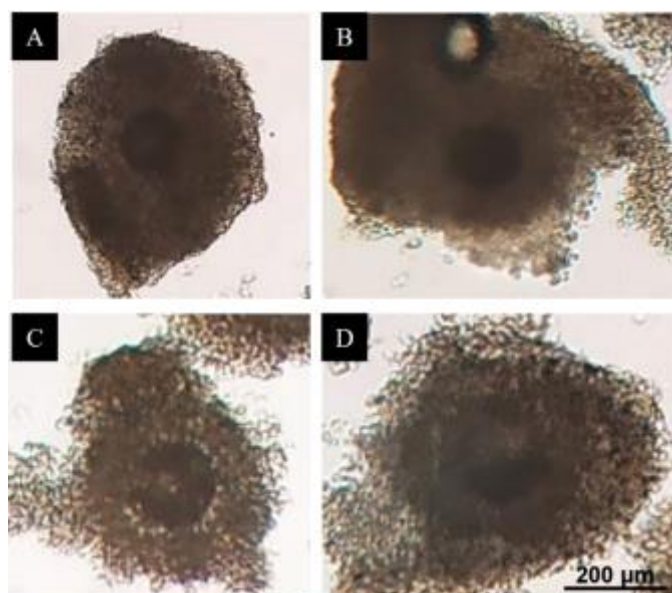


Figura 1 – CCOs classificados como grau I (A e B) e grau II (C e D), segundo a metodologia de Stojkovic (2001)

Fonte: MARTINS, 2025

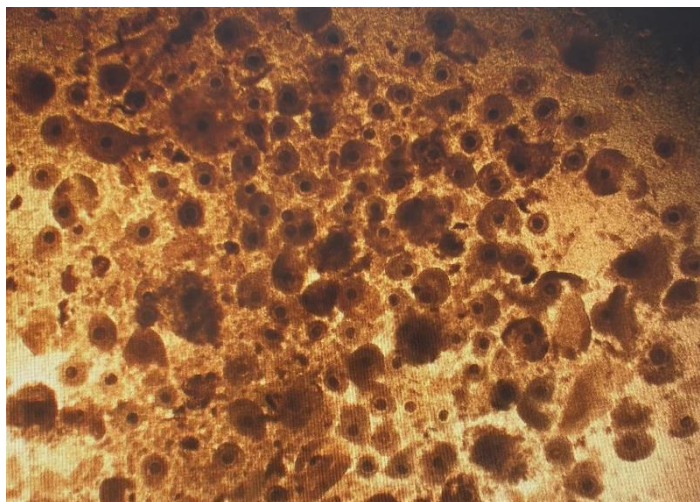


Figura 2 – CCOs obtidos durante o rastreio e que serão selecionados para progressão da PIVE

Fonte: elaborado pelo autor

3.2.2 Obtenção do sêmen

As amostras de sêmen de um touro com fertilidade comprovada utilizadas durante o desenvolvimento deste estudo foram doadas pela ABS Global Brasil. Em todo o estudo foi utilizado o sêmen de um único touro da raça Nerole (Touro Canela, código 1385).

3.2.3 Maturação *in vitro*

Os CCOs selecionados (figura 3) foram lavados três vezes em meio de lavagem (Vitrogen). Após isso, foram transferidos de 10 à 35 CCOs para tubos de cultivo contendo 400 μ L de meio de maturação (Vitrogen) e cobertos com 250 μ L de óleo mineral preparados com no mínimo 2 horas de antecedência à aspiração dos ovários e foram mantidos por 22h em estufa na temperatura de 37°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂, para que houvesse a maturação. Além disso, os tubos correspondentes ao grupo de agitação durante a MIV foram colocados em agitação leve por inclinação (3D) de forma contínua. Ao término do período de maturação os CCOs foram destinados à etapa de fertilização.



Figura 3 – CCOs selecionados para a maturação *in vitro*

Fonte: elaborado pelo autor

3.2.4 Fertilização *in vitro*

Os CCOs maturados foram lavados três vezes em microgotas de 80 μL de meio FIV (Vitrogen) e foram transferidos para gotas de 120 μL de meio FIV cobertas com óleo mineral em placas de poliestireno de 60 x 15 mm preparadas no dia anterior.

A fertilização *in vitro* inicia-se com a montagem de um mini-gradiente de Percoll. Para isso, em um tubo Eppendorf de 1,5 mL foram adicionados 200 μL de Percoll e 200 μL de TALP Sperm (Vitrogen), seguido da pipetagem de 400 μL de Percoll no fundo do tubo, formando o gradiente. O tubo foi então mantido em estufa por pelo menos 15 minutos para estabilização. Em seguida, uma palheta de sêmen previamente identificada (1385 touro Canela) foi retirada do galão de armazenamento, descongelada em banho-maria por 30 segundos à temperatura de 37°C e conduzida à sala de cultivo, protegida da luz. O conteúdo da palheta foi depositado cuidadosamente sobre a superfície do gradiente preparado. O material foi centrifugado a 3500 rpm por 5 minutos; após essa etapa, retirou-se 1 mL do sobrenadante e foi adicionado 1 mL de meio FIV (Vitrogen). Realizou-se uma nova centrifugação a 1000 rpm por 3 minutos, ao final da qual obteve-se um pellet de aproximadamente 70 μL . Desse volume, 5 μL foram destinados a um tubo eppendorf chamado tubo de concentração, sendo diluídos em 95 μL de água Milli-Q, enquanto o volume remanescente (65 μL) foi reservado em outro tubo chamado tubo de fertilização, para a etapa de avaliação de motilidade e, ao final, de execução da FIV.

A motilidade espermática foi avaliada a partir da retirada de uma alíquota de 5 μL do tubo de fertilização, a qual foi depositada sobre uma lâmina para observação em microscópio óptico previamente aquecida. A porcentagem de motilidade foi estimada visualmente, variando de 0 a 100%, conforme a proporção de espermatozoides móveis observados no campo.

Para a determinação da concentração espermática, utilizou-se o tubo previamente diluído na proporção de 1:20 (tubo de concentração). A câmara de Neubauer foi higienizada com água destilada, posicionada a lamínula específica e, após homogeneização da amostra, preencheu-se completamente ambos os compartimentos da câmara, evitando a formação de bolhas de ar. A contagem foi realizada na diagonal, considerando cinco quadrantes de cada lado, e calculou-se a média entre as duas leituras. O valor médio obtido corresponde ao número de espermatozoides presentes em 0,02 μL , sendo então multiplicado por 50 para conversão para 1 μL e, posteriormente, pelo fator de diluição (20), resultando em um fator total de correção de 1000. Assim, determinou-se a concentração total de espermatozoides por microlitro da presente rotina em execução.

A concentração de espermatozoides móveis foi obtida multiplicando-se a concentração total pela porcentagem de motilidade dividida por 100. Esse valor representa a quantidade efetiva de espermatozoides aptos à fecundação por microlitro. Ao multiplicar essa concentração pelo volume do pellet destinado à FIV, obtém-se o total de espermatozoides móveis disponíveis na rotina. Considerando-se a padronização de 10.000 espermatozoides para fecundar 1 ovócito, calcula-se o número total desejado de espermatozoides móveis de acordo com a quantidade de ovócitos a serem fecundados. O volume final necessário foi determinado dividindo-se o total desejado pela concentração de espermatozoides móveis por microlitro. Por fim, calculou-se o volume de meio FIV (Vitrogen), suplementado com heparina e penicilamina, hipotaurina e epinefrina (PHE), a ser adicionado ao pellet, considerando o volume final desejado e o volume de pellet disponível. Quando o valor calculado é negativo, interpreta-se que o pellet apresenta concentração superior à necessária, devendo-se utilizar apenas o volume correspondente ao cálculo e completar o restante com meio FIV, garantindo a padronização da concentração espermática para a fertilização.

Dessa forma, foi pipetado nas gotas contendo os ovócitos maduros o volume espermático calculado, e as placas de petri foram mantidas novamente em estufa na temperatura de 37°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO_2 , durante 19 horas, para que ocorresse a fertilização.

Para cada rotina de PIVE executada, todos os cálculos e passos foram refeitos conforme à qualidade da palheta de sêmen utilizada na presente semana de execução do experimento.

3.2.5 Cultivo *in vitro*

Após o período de incubação dos ovócitos com os espermatozoides, os prováveis zigotos foram desnudados mecanicamente por pipetações consecutivas, lavados por 3 vezes em meio CIV (Vitrogen) e transferidos para tubos de cultivo contendo 400 µL de meio CIV (Vitrogen) e cobertos com 250 µL de óleo mineral preparados no dia anterior, onde permaneceram por 6 dias sob agitação 3D.

Vinte e quatro horas após a fecundação dos ovócitos foram avaliadas as taxas de clivagem por meio de contagem dos zigotos que apresentaram duas ou mais células com o auxílio de microscópio estereoscópico. Por fim, sete dias após a fecundação foram avaliadas as taxas de desenvolvimento embrionário, por meio da contagem da quantidade de embriões que alcançaram o estágio de blastocisto com a utilização de microscópio estereoscópico, além de serem classificados em Blastocisto inicial (Bi), Blastocisto (Bl), Blastocisto expandido (Bx) ou Blastocisto em eclosão (Bn), de acordo com o protocolo da mesma empresa de utilização dos meios (Vitrogen). Também foram calculadas as taxas de blastocisto, as quais consistem na porcentagem de células totais que iniciaram a PIVE (CCOs) e chegaram em blastocisto.

3.3 Metodologia de agitação

O agitador KASVI modelo K45-4020, agitador Basic 3D, velocidade 20 Rpm, 220V (figura 4) foi mantido dentro de estufa com a placa agitadora funcionando a uma velocidade de 20 rpm durante todo o período designado (22h durante a maturação *in vitro* e 6 dias durante o cultivo *in vitro*). Para isso, foram utilizados dois suportes confeccionados pela equipe do Laboratório de Biologia da Reprodução, um de silicone e outro de biscoito, para apoiar os tubos de cultivo no equipamento e permitir a movimentação correta do meio de cultura. Do mesmo modo, os grupos controle também foram mantidos nos mesmos tipos de tubos de cultivo para simular as mesmas condições, ainda que sem a presença de agitação.

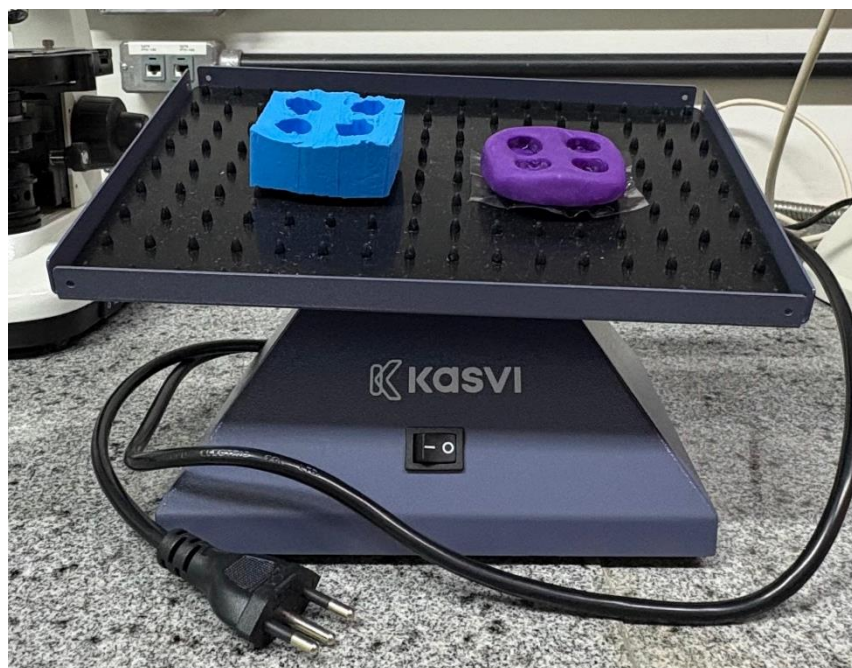


Figura 4 – Agitador KASVI modelo K45-4020, agitador Basic 3D, velocidade 20 Rpm, 220V utilizado durante as rotinas de PIVE.

Fonte: elaborado pelo autor

3.4 Avaliação estatística

Existem variáveis não controláveis em cada rotina de PIVE que podem influenciar o resultado mais do que a própria variável testada (agitação). Portanto, para que se tenha uma avaliação estatística mais confiável, para verificar a existência de diferenças significativas entre a rotinas de PIVE com agitação e o controle, foi realizado o teste t pareado.

Como as rotinas de PIVE com as duas variações utilizando agitação foram realizadas em momentos diferentes, para verificar a existência de diferença entre a agitação contínua durante MIV-CIV e apenas durante o CIV, os dados foram normalizados utilizando-se a diferença entre o método com agitação com seu respectivo controle. Desta forma foi possível utilizar o teste ANOVA bidirecional e como teste *post hoc* o t não pareado ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos em cada rotina de PIVE foram quantificados e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento embrionário das células presentes em cada rodada de experimentos. Desse modo, foi registrado o número de células que iniciaram a rotina de PIVE (ovócitos imaturos), a quantidade de possíveis zigotos (número de células que passaram pelo procedimento de FIV) e o número de células clivadas (células que iniciaram o desenvolvimento embrionário pela presença e multiplicação de blastômeros). Por fim, 6 dias após o cultivo embrionário foi quantificado o número de blastocistos formados, considerando blastocisto inicial (Bi) o estágio no qual a blastocele começa a se formar, blastocisto (Bl) o estágio que apresenta a blastocele mais desenvolvida e organizada, blastocisto expandido (Bx) no qual a blastocele ocupa praticamente todo o volume embrionário, promovendo um aumento de tamanho, e blastocisto em eclosão (Bn) no qual o embrião inicia a ruptura da zona pelúcida, permitindo que parte de sua estrutura comece a sair para o meio externo. Os embriões produzidos e as respectivas classificações podem ser observados na figura 5.

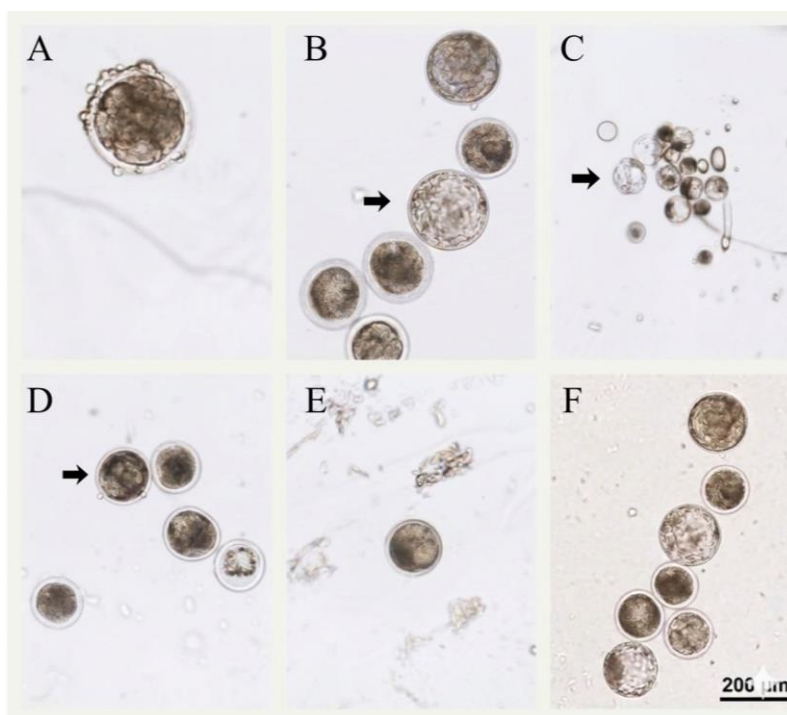


Figura 5 – A: Embrião clivado, **B:** blastocisto expandido (seta), **C:** blastocisto em eclosão (seta), **D:** blastocisto inicial (seta), **E:** blastocisto, obtidos durante as rotinas, e **F:** escala gráfica.

Fonte: elaborado pelo autor

4.1 Agitação durante a MIV e o CIV

Os resultados obtidos em cada rotina de PIVE estão demonstrados nas tabelas 1 (Controle) e 2 (agitação durante a MIV e o CIV)

Tabela 1 – Número de ovócitos imaturos, zigotos, embriões clivados e blastocistos obtidos nos grupos controle em cada rotina de PIVE.

Rotina controle	Ovócitos imaturos	Zigotos	Clivados	Bi	Bl	Bx	Bn
1	28	28	20	2	2	0	0
2	22	9	7	2	1	0	0
3	22	17	11	2	4	0	0
4	32	18	11	0	6	0	0
5	15	15	9	4	3	2	0
6	15	15	11	3	1	2	0
7	15	15	10	2	1	3	0
8	15	15	7	2	1	1	1

Legenda: Blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl), blastocisto expandido (Bx) e blastocisto em eclosão (Bn)

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 2 – Número de ovócitos, zigotos, embriões clivados e blastocistos obtidos nos grupos de agitação MIV-CIV em cada rotina de PIVE.

Rotina agitação MIV-CIV	Ovócitos imaturos	Zigotos	Clivados	Bi	Bl	Bx	Bn
1	26	25	16	1	0	0	0
2	22	20	13	2	1	1	0
3	22	20	7	2	1	0	0
4	32	25	15	3	1	0	0
5	15	15	11	1	2	1	0
6	15	15	10	3	0	0	0
7	15	15	8	3	2	0	0
8	15	15	10	1	2	1	0

Legenda: Blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl), blastocisto expandido (Bx) e blastocisto em eclosão (Bn)

Fonte: Elaborado pelo autor

Através do Teste T Pareado, que comparou as taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário e blastocisto entre os grupos de agitação e controle, verificou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) nas taxas de desenvolvimento embrionário e blastocisto (Tabela 3).

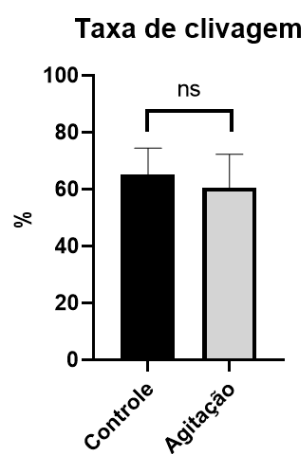
Tabela 3 – Resultados das taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário e blastocisto obtidos nos grupos de agitação MIV-CIV e controle em cada rotina de PIVE, e valor de P encontrado na comparação das taxas utilizando o Teste T Pareado.

Rotina Controle	Taxa de Clivagem Controle	Taxa Desenvolvimento embrionário Controle	Taxa Blastocisto controle
1	71.40%	15.00%	10.71%
2	77.00%	42.80%	13.64%
3	64.00%	54.50%	27.27%
4	61.00%	55.00%	19.00%
5	60.00%	100.00%	60.00%
6	73.00%	55.00%	40.00%
7	67.00%	60.00%	40.00%
8	47.00%	57.00%	27.00%
Rotina agitação MIV-CIV	Taxa Clivagem agitação	Taxa Desenvolvimento embrionário agitação	Taxa Blastocisto agitação
1	64.00%	6.25%	3.84%
2	65.00%	30.70%	18.18%
3	35.00%	40.80%	13.64%
4	60.00%	27.00%	13.00%
5	73.00%	37.00%	27.00%
6	67.00%	30.00%	20.00%
7	53.00%	63.00%	33.00%
8	67.00%	40.00%	27.00%
Valor de P	0.4330	0.0211	0.0448

Fonte: Elaborado pelo autor

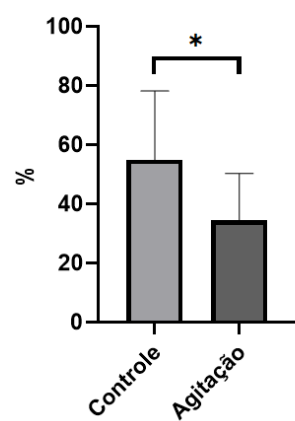
As análises estatísticas das comparações entre as taxas obtidas nos grupos de agitação e controle também podem ser observadas pelos gráficos da figura 6.

A)



B)

Taxa de desenvolvimento embrionário



C)

Taxa de blastocisto

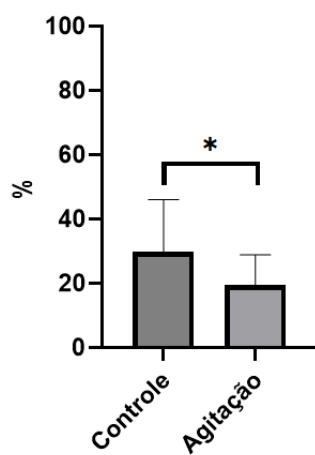


Figura 6 – Gráficos das comparações entre as taxas de clivagem (A), desenvolvimento embrionário (B) e blastocisto (C) dos grupos controle e agitação durante os períodos de maturação *in vitro* e cultivo *in vitro*, sendo **ns** (*non-significant*) resultado não significativo e ***** (*significant*) resultado significativo.

4.2 Agitação apenas durante o Cultivo embrionário

Os resultados obtidos em cada rotina de PIVE estão demonstrados nas tabelas 4 (Controle) e 5 (agitação apenas durante o CIV)

Tabela 4 – Número de ovócitos imaturos, zigotos, embriões clivados e blastocistos obtidos nos grupos controle em cada rotina de PIVE.

Rotina controle	Ovócitos imaturos	Zigotos	Clivados	Bi	Bl	Bx	Bn
1	14	10	5	0	2	0	0
2	14	10	3	3	0	0	0
3	20	12	8	4	2	2	0
4	20	18	10	4	4	0	1
5	35	34	27	2	5	1	0
6	15	15	10	1	3	1	0
7	15	9	7	0	3	0	0
8	15	15	13	2	3	1	0

Legenda: Blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl), blastocisto expandido (Bx) e blastocisto em eclosão (Bn)

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 5 – Número de ovócitos, zigotos, embriões clivados e blastocistos obtidos nos grupos de agitação durante o CIV em cada rotina de PIVE.

Rotina agitação CIV	Ovócitos imaturos	Zigotos	Clivados	Bi	Bl	Bx	Bn
1	14	14	9	2	1	1	0
2	14	13	6	1	1	1	0
3	20	19	12	4	2	0	0
4	20	19	9	3	2	0	0
5	35	31	21	5	2	0	0
6	15	12	8	2	2	0	0
7	15	14	10	0	2	0	0
8	15	12	8	1	1	1	0

Legenda: Blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl), blastocisto expandido (Bx) e blastocisto em eclosão (Bn)

Fonte: Elaborado pelo autor

Através do Teste T Pareado, que comparou as taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário e blastocisto entre os grupos de agitação e controle, verificou-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) apenas na taxa de desenvolvimento embrionário (Tabela 6).

Tabela 6 – Resultados das taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário e blastocisto obtidos nos grupos de agitação durante o CIV e controle em cada rotina de PIVE, e valor de P encontrado na comparação das taxas utilizando o Teste T Pareado.

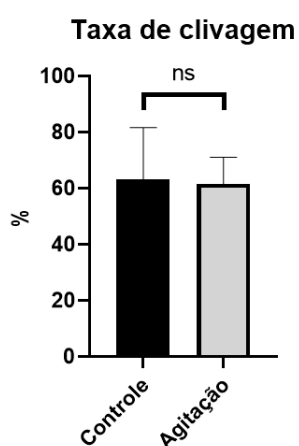
Rotina Controle	Taxa de Clivagem Controle	Taxa Desenvolvimento embrionário Controle	Taxa Blastocisto controle
1	50.00%	40.00%	14.29%
2	30.00%	100.00%	21.43%
3	58.00%	100.00%	40.00%
4	55.00%	80.00%	45.00%
5	79.00%	30.00%	23.00%
6	67.00%	50.00%	33.00%
7	78.00%	43.00%	20.00%
8	87.00%	46.00%	60.00%

Rotina agitação CIV	Taxa Clivagem agitação	Taxa Desenvolvimento embrionário agitação	Taxa Blastocisto agitação
1	64.00%	44.00%	28.57%
2	46.00%	50.00%	21.47%
3	63.00%	50.00%	30.00%
4	47.00%	55.50%	25.00%
5	67.00%	33.00%	20.00%
6	67.00%	50.00%	27.00%
7	71.00%	20.00%	13.00%
8	67.00%	38.00%	20.00%
Valor de P	0.7467	0.0500	0.1536

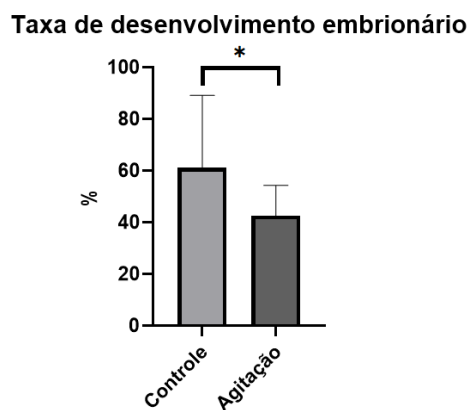
Fonte: Elaborado pelo autor

As análises estatísticas das comparações entre as taxas obtidas nos grupos de agitação e controle também podem ser analisadas pelos gráficos da figura 7:

A)



B)



C)

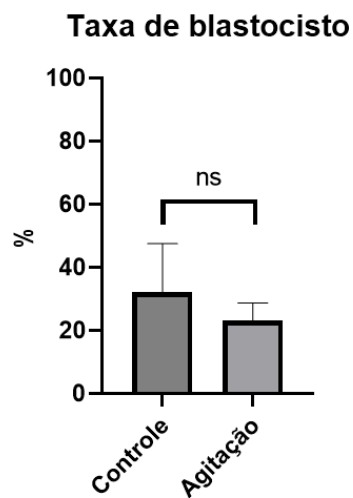


Figura 7 – Gráficos das comparações entre as taxas de clivagem (A), desenvolvimento embrionário (B) e blastocisto (C) dos grupos controle e agitação durante apenas o período de cultivo *in vitro*, sendo **ns** (*non-significant*) resultado não significativo e ***** (*significant*) resultado significativo.

5. DISCUSSÃO

A produção *in vitro* de embriões configura uma das principais biotecnologias reprodutivas presentes no mercado e que propicia o aproveitamento genético máximo de um mesmo animal, sem a necessidade de aguardar o tempo reprodutivo natural dos indivíduos, de modo a potencializar a produção em um intervalo reduzido. Ainda assim, a gama de novas tecnologias que estão sendo produzidas para aumentar a eficiência da PIVE demonstra a relevância desse tema e o amplo espaço para aprimorar as limitações existentes atualmente. Nesse sentido, este estudo buscou investigar o impacto da metodologia de agitação 3D lenta por inclinação, por intermédio de um equipamento que pudesse ser acessível e replicável, evitando grandes investimentos e protocolos complexos.

Ao analisar os resultados obtidos, é possível observar que a aplicação da agitação 3D lenta por inclinação não teve impacto significativo nas taxas de clivagem em ambos os testes, porém teve efeito negativo sobre o desenvolvimento embrionário e, no protocolo MIV-CIV, também sobre a taxa de blastocistos. A ausência de diferença significativa nas taxas de clivagem, associada à redução no desempenho embrionário subsequente, sugere que os efeitos prejudiciais da agitação se manifestam, principalmente, em estágios posteriores do desenvolvimento inicial, quando a dependência do microambiente de cultivo se torna mais crítica.

A clivagem inicial é um processo sustentado por fatores maternos acumulados previamente à fecundação, como RNAs, proteínas regulatórias e organelas funcionais. Estudos indicam que essa etapa apresenta menor sensibilidade a variações ambientais moderadas, sendo que alterações no microambiente tendem a se manifestar de forma mais evidente após a ativação do genoma embrionário (LONERGAN; FAIR, 2016). Dessa forma, o fato de a agitação não ter interferido na clivagem tanto quando houve aplicação do estímulo mecânico durante a maturação *in vitro* quanto quando a MIV foi executada de modo tradicional sugere que o estímulo mecânico aplicado não comprometeu os mecanismos básicos e iniciais de divisão celular.

Além disso, os ovócitos utilizados neste estudo foram selecionados segundo critérios de avaliação previamente estudados (STOJKOVIC et al., 2001) e a capacidade fecundante do touro também já era comprovada, logo, é plausível afirmar que a competência inicial para divisão não tenha sido sensível ao estímulo mecânico aplicado. Esses resultados reforçam que a avaliação

da taxa de clivagem, isoladamente, não é um marcador de qualidade embrionária global (RIZOS et al., 2002).

Em contraste, o desenvolvimento embrionário do zigoto até blastocisto envolve processos biológicos mais complexos e sensíveis, que incluem a ativação do genoma embrionário, a reorganização metabólica e o estabelecimento de padrões epigenéticos adequados (SWAILI; SHELLING, 2009). Em bovinos, a ativação genômica ocorre no estágio de 8 a 16 células, período no qual o embrião passa a depender de sua própria capacidade transcricional (BRAUDE; BOLTON; MOORE, 1988). Nessa fase, alterações ainda que pequenas no microambiente físico podem desencadear respostas celulares adversas, comprometendo a progressão ao estágio de blastocisto.

Além disso, os embriões antes da implantação, enquanto estão em desenvolvimento, são altamente sensíveis a estresses mecânicos. Pesquisas em mecanotransdução celular demonstram que forças físicas contínuas podem alterar a organização do citoesqueleto, afetar junções celulares e modificar a polarização celular durante a compactação (DUFORT; PASZEK; WEAVER, 2011). A formação adequada do blastocisto exige coordenação entre massa celular interna e trofoectoderma, processo este que depende da estabilidade estrutural do embrião. A movimentação constante pode ter interferido nessa organização, resultando na menor eficiência do desenvolvimento.

Adicionalmente, a exposição contínua ao estímulo mecânico desde a maturação *in vitro* (protocolo de agitação MIV-CIV) pode ter reduzido a competência intrínseca dos ovócitos, gerando embriões aparentemente viáveis nas primeiras divisões, porém metabolicamente menos aptos a sustentar o desenvolvimento até o blastocisto. Estudos demonstram que a exposição do ovócito a condições adversas durante a MIV pode comprometer a formação de blastocistos, mesmo quando a taxa de clivagem inicial não é afetada, indicando que o impacto do estresse biológico se manifesta principalmente em estágios posteriores do desenvolvimento (GÓMEZ-GUZMÁN et al., 2024). Esse efeito acumulativo ressalta por que apenas o grupo submetido à agitação durante todo o período MIV-CIV apresentou impacto significativo também na taxa final de blastocistos.

Nesse sentido, apesar da vasta quantidade de estudos que utilizam sistemas dinâmicos para mimetizar o ambiente fisiológico natural, os efeitos positivos relatados na literatura dependem de parâmetros específicos de intensidade e frequência. Uma hipótese é que a exposição contínua à agitação a 20 rpm aplicada neste estudo, pode ter representado um estímulo mecânico superior ao limiar fisiológico tolerável pelos embriões bovinos. Sistemas de

“rocking culture” já foram avaliados anteriormente em bovinos com resultados variáveis (VALDEZ et al., 1994), sugerindo que o benefício do movimento depende de ajustes finos. O uso de plataformas dinâmicas deve considerar a velocidade, o intervalo e a intensidade do estímulo, uma vez que o ambiente uterino natural envolve movimentos sutis e intermitentes.

Deve-se considerar, contudo, que este estudo avaliou apenas uma velocidade de agitação (20 rpm), sendo necessários novos experimentos para determinar se frequências menores ou regimes intermitentes poderiam gerar efeitos distintos.

Ademais, o cultivo tradicional, embora limitado, proporciona relativa estabilidade físico-química (MACIEL; MASQUIO; TEIXEIRA, 2025). Assim, a introdução de movimento contínuo pode ter alterado gradientes locais de gases e metabólitos, visto que distúrbios na metilação global e na estabilidade epigenética durante o desenvolvimento embrionário bovino estão associados a variações nas condições de cultivo (MIMURA et al., 2023). Nesse contexto, a agitação, embora lenta, pode ter sido suficiente para provocar alterações significativas e comprometer o desenvolvimento.

Portanto, os resultados deste estudo indicam que, nas condições testadas, a agitação 3D lenta por inclinação exerceu efeito prejudicial sobre o desenvolvimento embrionário bovino, sem impactar a clivagem inicial. Esse padrão reforça que etapas posteriores do desenvolvimento são mais sensíveis ao microambiente físico ao qual os embriões são submetidos e que a introdução de estímulos mecânicos contínuos pode comprometer processos metabólicos, estruturais e epigenéticos essenciais para a formação do blastocisto. O uso da agitação contínua a 20 rpm pode ter imposto um estresse mecânico crônico, capaz de afetar o cultivo *in vitro* e o desenvolvimento celular. Isto demonstra que a introdução de dinamismo físico no CIV deve ser cuidadosamente calibrada, considerando intensidade, frequência e tempo de exposição, uma vez que pequenas variações podem resultar em impacto biológico significativo.

Dessa forma, uma alternativa adicional para continuidade deste estudo e correção das condições testadas para que o uso desta metodologia de baixo custo e fácil aplicação seja benéfica à PIVE é implementar o estímulo mecânico em regimes intercalados, isto é, programar o agitador para funcionar de maneira intermitente durante um curto período de tempo ao longo da etapa de cultivo *in vitro*. Assim, a movimentação seria controlada e os impactos físicos e biológicos sobre os embriões seriam mitigados.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que a agitação 3D lenta por inclinação, embora seja uma alternativa promissora devido à simplicidade, baixo custo e fácil aplicação, ainda requer ajustes no estímulo mecânico empregado.

As taxas de clivagem não apresentaram diferenças significativas entre os protocolos, indicando que o estímulo mecânico durante a maturação *in vitro* não interfere na quantidade inicial de embriões produzidos. Contudo, o desenvolvimento embrionário foi afetado negativamente em ambos os regimes de agitação, evidenciando que o cultivo *in vitro* é uma etapa mais sensível e suscetível a variações do meio.

A redução significativa na taxa de blastocistos no protocolo com agitação contínua (MIV-CIV) sugere que a exposição prolongada ao estímulo mecânico compromete a viabilidade embrionária, mesmo sem impactar as clivagens iniciais.

Dessa forma, apesar da proposta de mimetizar o ambiente fisiológico ser conceitualmente adequada, a estratégia necessita de refinamento. Desse modo, os resultados reforçam a necessidade de novos estudos com diferentes regimes de agitação para validar a agitação 3D lenta por inclinação como alternativa para otimização da PIVE.

7. REFERÊNCIAS

- BAE, C. H. Mechanical stimulation of bovine embryos in a microfluidic culture platform. *BioChip Journal*, v. 5, p. 106-113, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13206-011-5202-4>.
- BATISTELA, M. V.; PEREIRA, J. L.; NASCIMENTO, V.; DIAS, M. Produção *in vitro* de embriões e novas estratégias na produção de oócitos em bovinos. *Enciclopédia Biosfera*, Goiânia, v. 20, n. 46, p. 201-233, 2023.
- BIERMAN, P. et al. In vitro maturation of oocytes alters gene expression and signaling pathways in bovine cumulus cells. *Theriogenology*, v. 180, p. 12-22, 2022.
- BONTEOE, S. et al. Low-frequency electromagnetic fields or micro-vibration for enhancing embryo development in assisted reproduction. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 7, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. *Projeções do Agronegócio: Brasil 2022/23 a 2032/33*. Brasília: MAPA, 2023.
- BRAUDE, P.; BOLTON, V.; MOORE, S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*, London, v. 332, p. 459–461, 1988.
- DUFORT, C. C.; PASZEK, M. J.; WEAVER, V. M. Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, London, v. 12, p. 308–319, 2011.
- FALEH, A. M. et al. Mechanical stimulation of bovine oocytes during in vitro maturation: effect on development and gene expression. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 30, n. 1, p. 195, 2018.
- GARCIA-GARCIA, R. M. et al. Mechanical vibration of the culture plate affects the development and quality of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 27, n. 1, p. 191, 2014.

GÓMEZ-GUZMÁN, Javier A. et al. *Impact of heat stress on oocyte developmental competence and pre-implantation embryo viability in cattle*. **Animals (Basel)**, v. 14, n. 15, p. 2280, 2024. DOI: 10.3390/ani14152280.

HEO, Y. S. et al. Culture on a chip: a better way to produce embryos. *Expert Review of Medical Devices*, v. 7, n. 6, p. 731-733, 2010.

KIM, Tae-Gyun; CHOE, Yong-Ho; KIM, Sung-Ho; LEE, Sang-Yup; JANG, Min; YUN, Sung-Ho; KIM, Seung-Joon; LEE, Sung-Lim; LEE, Won-Jae. Increased apoptosis in late-developing in vitro fertilized bovine blastocysts decreases successful pregnancy. *Animal Bioscience*, v. 38, n. 3, p. 454–465, mar. 2025. DOI: <https://doi.org/10.5713/ab.24.0454>.

KOO, Y. D. et al. 3D-bioprinted gelatin methacryloyl hydrogel culture system emulating the oviduct environment for enhanced preimplantation embryo development. *International Journal of Bioprinting*, v. 10, n. 4, art. 3346, 2024. DOI: <https://doi.org/10.36922/ijb.3346>.

LONERGAN, P.; FAIR, T. The art of studying early embryo development: progress and challenges in ruminant embryo culture. *Theriogenology*, Amsterdam, v. 86, p. 49–55, 2016.

MACIEL, K. C.; MASQUIO, J. A.; TEIXEIRA, M. M. In vitro production of bovine embryos: literature review. *Research, Society and Development*, v. 14, n. 6, e6314649073, 2025. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsdv14i6.49073>.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. *Sumário Executivo do Agronegócio*. Brasília, DF: MAPA, 2024.

MARTINS, M. C. Avaliação da suplementação do meio de maturação in vitro de ovócitos bovinos com beta-NGF. 2025. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2025.

MATSUURA, K. et al. A tilting culture system maintains the developmental potential of mice embryos. *Human Reproduction*, v. 25, n. 11, p. 2700-2710, 2010.

MATSUURA, K. et al. Improved development of mouse and human embryos using a tilting embryo culture system. *Human Reproduction*, v. 25, n. 11, p. 2700-2710, 2010.

MATSUURA, K. et al. A tilting embryo culture system increases the number of high-grade human blastocysts with high implantation competence. *Fertility and Sterility*, v. 98, n. 3, p. S198, 2012.

MIMURA, K. et al. Global methylation status of bovine oocytes before and after IVM and during early embryonic development. *Theriogenology*, v. 198, p. 95-104, 2023.

MIZOBE, Y. et al. Improvement of development of vitrified/thawed bovine 2-cell embryos by exposure to micro-vibration. *Journal of Reproduction and Development*, v. 56, n. 2, p. 284-290, 2010.

MIZOBE, Y. et al. Mechanical agitation during the in vitro culture of human pre-implantation embryos drastically increases the pregnancy rate. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 22, n. 4, p. 369-377, 2011.

PONTES, J. H. F. et al. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus* and *Bos indicus* donor cows. *Theriogenology*, v. 74, n. 8, p. 1349-1355, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.004>.

PRENTICE-BIERMAN, A. et al. Impact of dynamic culture systems on bovine oocyte maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology*, v. 180, p. 12-22, 2022.

RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002.

ROCHA, L. O. et al. Methods used to assess bull sperm chromatin integrity and its correlation with in vitro embryo production efficiency. *Veterinary Sciences*, v. 12, p. 184, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci12020184>.

RUIZ-CONCA, M. et al. Melatonin and coenzyme Q10 supplementation during in vitro maturation improves bovine oocyte quality. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 58, p. 124-131, 2023.

SANTOS, A. C. et al. Micro-vibration results in in vitro-derived bovine blastocysts with greater cryotolerance, epigenetic abnormalities, and a massive transcriptional change. *Theriogenology*, v. 196, p. 214-226, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.11.004>.

SANTOS, J. E. P. et al. Reproductive management of dairy cows. *Animal Reproduction*, v. 21, n. 3, p. 1-15, 2024.

SILVA, R. T. da. Compactação da cromatina e morfometria da cabeça de espermatozoides na produção de embriões in vitro utilizando touros zebuínos. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2010>.

SIRARD, M.-A. et al. The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the developmental competence of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*, v. 132, n. 1-2, p. 23-31, 2012.

STOJKOVIC, M. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization culture. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 904-909, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>.

SWAILI, J. S.; SHELLING, A. N. Genetic and epigenetic dynamics of early mammalian development. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 21, n. 1, p. 78-89, 2009.

SWAILI, J. S.; SHELLING, A. N. Optimising the culture environment and embryo manipulation to help maintain embryo developmental potential. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2009.

SWAILI, J. S. et al. Beneficial effects of a dynamic micro-vibration culture system on murine embryo development and blastocyst quality. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 22, n. 4, p. 369-377, 2011.

TADROS, W.; LIPSHITZ, H. D. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*, Cambridge, v. 136, n. 18, p. 3033–3042, 2009.

VALDEZ, C. A. et al. The effect of a rocking culture system on the development of bovine embryos in vitro. *Theriogenology*, v. 41, n. 1, p. 326, 1994.

WANG, Z. et al. Effects of mechanical stimulation on the development of oocytes and embryos. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 1-12, 2021.

YAMANAKA, K. et al. Development of a micro-vibration culture system for embryo culture. *Journal of Mammalian Ova Research*, v. 27, n. 2, p. 94-101, 2010.

ZHANG, J. et al. Advances in three-dimensional in vitro culture systems for bovine embryo development. *Cells*, v. 13, n. 24, 2024.