

<https://doi.org/10.31533/pubvet.v19n10e1852>

Uso de progesterona na fertilização *in vitro* como avanço sustentável para a produção de embriões ovinos

Rafaeli Fagá Daniel¹, Fábio Luiz Bim Cavalieri², Isabele Picada Emanuelli², Danieli Aparecida Bóbbio Moreski³, Marcia Aparecida Andreazzi^{2*}, Raquel Zaneti Puelker⁴, José Maurício Gonçalves dos Santos⁵, Iamara Carvalho Sabatino Bento⁶, Antonio Hugo Bezerra Colombo¹

¹Mestre em Tecnologias Limpas, Universidade Cesumar, Maringá, Paraná, Brasil.

²Pesquisador(a) ICETI. Docente do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas e do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Cesumar, Maringá, Paraná, Brasil

³Doutora em Zootecnia. Gestar Embriões, Maringá, Paraná, Brasil.

⁴Doutora em Reprodução Animal. Progest Biotecnologia em Reprodução Animal, Anhembi, São Paulo, Brasil.

⁵Docente do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Cesumar, Maringá, Paraná, Brasil.

*Autor para correspondência, e-mail: marcia.andreazzi@unicesumar.edu.br

Resumo. A produção *in vitro* de embriões (PIVE) apresenta diversos benefícios para a ovinocultura. Contudo, para se obter bons índices com essa biotecnologia, é necessário utilizar soro de ovelhas em estro (SOE), um produto obtido a campo, que não é padronizado nem comercializado. Uma alternativa para esse problema é sua substituição pelo hormônio progesterona (P4), uma vez que a P4 apresenta efeitos positivos na capacitação espermática, podendo, consequentemente, melhorar os resultados da PIVE. O objetivo deste estudo foi comparar a adição de SOE e de P4 no meio de fertilização *in vitro* (FIV) e avaliar a produção *in vitro* de embriões da espécie ovina. O estudo foi conduzido no Centro de Biotecnologia da UniCesumar, Maringá, Paraná, Brasil. Os complexos cúmulo-oócito foram obtidos de ovários coletados em abatedouros, provenientes de 100 fêmeas pré-púberes, e maturados em meio comercial. A fertilização foi realizada em meio FIV suplementado com 10% de SOE (grupo controle: FIV-SOE) ou com 1 µL/mL (0,1%) de P4 (grupo teste: FIV-P4), onde os espermatozoides permaneceram por uma hora antes da coincubação com os oócitos. Em seguida, os zigotos foram cultivados *in vitro* em atmosfera com 90% de N₂, 5% de CO₂ e 5% de O₂ sendo o desenvolvimento embrionário avaliado no 2º, 7º e 10º dias de cultivo. Os dados foram tabulados e as variáveis analisadas pelo procedimento estatístico PROC GENMOD. A taxa de maturação foi de 68%, com uma média de 1,53 oócitos viáveis por animal. As taxas de clivagem (43,89% vs. 26,66%), de formação de blastocistos (24,44% vs. 14,44%) e de eclosão de blastocistos (50,00% vs. 11,11%) foram maiores ($P < 0,05$) no grupo FIV contendo progesterona (FIV-P4). Conclui-se que a adição de P4 ao meio de FIV melhora a eficiência e contribui para a sustentabilidade da PIVE em ovinos.

Palavras-chave: Biotecnologia da reprodução, espermatozoide, fecundação *in vitro*, ovinocultura sustentável, reprodução animal.

Use of progesterone in vitro fertilization as a sustainable advancement for ovine embryo production

Abstract. *In vitro* embryo production (IVEP) offers several benefits for sheep farming. However, achieving optimal results with this biotechnology typically requires the use of estrous ewe serum (EES), a product obtained in the field that is neither standardized nor commercially available. One potential alternative is the use of the hormone progesterone (P4), which has demonstrated positive effects on sperm capacitation and may therefore enhance IVEP outcomes. This study aimed to compare the supplementation of *in vitro*

fertilization (IVF) media with EES and P4, and to evaluate the resulting *in vitro* production of sheep embryos. The experiment was conducted at the UniCesumar Biotechnology Center, Maringá, Paraná, Brazil. Cumulus-oocyte complexes were obtained from ovaries collected at slaughterhouses from 100 prepubertal females and matured in a commercial medium. Fertilization was performed in IVF medium supplemented with either 10% EES (control group: IVF-EES) or 1 $\mu\text{L/mL}$ (0.1%) of P4 (test group: IVF-P4). Sperm were incubated in the medium for 1 hour prior to co-incubation with oocytes. Subsequently, zygotes were cultured *in vitro* in a gas mixture of 90% N_2 , 5% CO_2 , and 5% O_2 . Embryo development was assessed on days 2, 7, and 10 of culture. Data were tabulated and analyzed using the PROC GENMOD procedure. The oocyte maturation rate was 68%, with an average of 1.53 viable oocytes per animal. The IVF-P4 group showed higher ($P < 0.05$) cleavage rates (43.89% vs. 26.66%), blastocyst formation (24.44% vs. 14.44%), and hatched blastocysts (50% vs. 11.11%) compared to the IVF-EES group. In conclusion, supplementation of IVF media with progesterone enhances the efficiency and sustainability of IVEP in sheep.

Keywords: Animal reproduction, *in vitro* fertilization, reproductive biotechnology, sustainable sheep farming, sperm capacitation.

Uso de progesterona en la fertilización in vitro como un avance sostenible para la producción de embriones ovinos

Resumen. La producción *in vitro* de embriones (PIVE) presenta diversos beneficios para la ovinocultura. Sin embargo, para obtener buenos índices con esta biotecnología, es necesario utilizar suero de ovejas en estro (SOE), un producto obtenido en el campo, que no está estandarizado ni comercializado. Una alternativa a este problema es su sustitución por la hormona progesterona (P4), ya que la P4 presenta efectos positivos en la capacitación espermática, lo que podría, en consecuencia, mejorar los resultados de la PIVE. El objetivo de este estudio fue comparar la adición de SOE y de P4 al medio de fertilización *in vitro* (FIV) y evaluar la producción *in vitro* de embriones de la especie ovina. El estudio fue realizado en el Centro de Biotecnología de UniCesumar, Maringá, Paraná, Brasil. Los complejos cúmulo-oocito fueron obtenidos de ovarios recolectados en mataderos, provenientes de 100 hembras prepúberes, y madurados en un medio comercial. La fertilización se llevó a cabo en un medio FIV suplementado con 10% de SOE (grupo control: FIV-SOE) o con 1 $\mu\text{L/mL}$ (0,1%) de P4 (grupo experimental: FIV-P4), donde los espermatozoides permanecieron durante una hora antes de la coincubación con los oocitos. Posteriormente, los cigotos fueron cultivados *in vitro* en una atmósfera con 90% N_2 , 5% de CO_2 y 5% de O_2 . El desarrollo embrionario fue evaluado en los días 2, 7 y 10 de cultivo. Los datos fueron tabulados y las variables analizadas mediante el procedimiento estadístico PROC GENMOD. La tasa de maduración fue del 68%, con un promedio de 1,53 oocitos viables por animal. Las tasas de clivaje (43,89% vs. 26,66%), formación de blastocistos (24,44% vs. 14,44%) y eclosión de blastocistos (50,00% vs. 11,11%) fueron mayores ($P < 0,05$) en el grupo FIV con progesterona (FIV-P4). Se concluye que la adición de P4 al medio de FIV mejora la eficiencia y contribuye a la sostenibilidad de la PIVE en ovinos.

Palabras clave: Biotecnología de la reproducción, espermatozoide, fecundación *in vitro*, ovinocultura sostenible, reproducción animal.

Introdução

O emprego de biotecnologias da reprodução em pequenos ruminantes promove o aumento da produtividade anual, contribui para a conservação de recursos genéticos, intensifica a presença de genes desejáveis no plantel ([Baruselli et al., 2021](#); [Bernardi, 2018](#); [Fonseca et al., 2016](#); [Rocha-Frigoni et al., 2014](#); [Traldi, 2009](#)) e favorece o mercado de exportação de material genético, como sêmen e embriões ([BRASIL, 2023](#)).

Dentre as biotecnologias aplicadas à ovinocultura, destacam-se a múltipla ovulação associada à transferência de embriões e a produção e transferência juvenil de embriões *in vitro*, por tornarem a cadeia produtiva mais eficiente, sustentável e rentável (Fonseca et al., 2014; Granleese et al., 2019).

De fato, a adoção de protocolos de produção *in vitro* de embriões (PIVE) aumenta significativamente o número de cordeiros nascidos (Basso et al., 2008; Fonseca et al., 2014, 2016; Simplicio et al., 2007). No entanto, a PIVE em ovinos ainda apresenta limitações, exigindo aprimoramentos técnicos (Falchi et al., 2022; Zhu et al., 2018), especialmente na etapa de fertilização *in vitro* (FIV), considerada uma das mais desafiadoras.

Estudos indicam bons resultados com o uso de soro de ovelhas em estro (SOE) na capacitação espermática durante a FIV (Castilho et al., 2013; Sánchez-Ajofrín et al., 2022; Santos & Barcelos, 2012). A adição de 2% a 10% de SOE promove a remoção da membrana de colesterol dos espermatozoides, favorecendo sua capacitação e subsequente fecundação (Barrera et al., 2018; Castilho et al., 2013; Takada et al., 2009). Contudo, o SOE é um produto obtido em campo, não comercializado nem padronizado, o que compromete a reprodutibilidade dos resultados (Rocha-Frigoni et al., 2014; Romão et al., 2013).

Diante disso, pesquisadores têm investigado substituições ao uso de SOE, como a adição de melatonina (Gimeno-Martos et al., 2019), lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Bernecic et al., 2021) e hormônios, como o estradiol (García-Álvarez et al., 2015) e a progesterona (P4) (Albesa et al., 2022).

Dentre esses hormônios, a P4 destaca-se por seu papel na regulação do ciclo estral e por estar presente no fluido das tubas uterinas (García-Álvarez et al., 2015; Hafez & Hafez, 2004). Estudos com espermatozoides *in vitro* apontam que a P4 induz a seleção de células com maior motilidade e vigor (Gatica et al., 2013), estimula o rápido influxo de cálcio (Albesa et al., 2022; Emiliozzi et al., 1996) e promove a quimioatração espermática, facilitando a seleção celular e aumentando a taxa de fecundação (Li et al., 2018). Dessa forma, acredita-se que a progesterona possa substituir o SOE, aprimorando a FIV em ovinos. Considerando a relevância da transferência juvenil de embriões *in vitro* na redução do intervalo entre gerações e na sustentabilidade econômica da ovinocultura, este estudo teve como objetivo comparar a adição de SOE e de P4 ao meio de FIV e avaliar sua influência na produção *in vitro* de embriões ovinos.

Material e métodos

Local e período do experimento

O estudo foi conduzido em 2024, no Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal do Centro de Biotecnologia (BIOTEC), localizado na Fazenda Escola da Universidade Cesumar (UniCesumar), em Maringá, Paraná, Brasil.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com a Lei de Procedimentos Científicos com Animais (1986), Resolução CONCEA nº 51/2021 e a Diretiva da União Europeia 2010/63.

Produção dos embriões

A coleta, seleção dos complexos cúmulo-oócito (COCs) e a maturação *in vitro* foram realizadas com COCs obtidos de ovários de 100 cordeiras pré-púberes (20 a 28 semanas de idade), mestiças de raças com aptidão para carne, predominantemente Texel. Os ovários foram coletados em um matadouro localizado em Guarapuava, Paraná, Brasil. Após a coleta, foram lavados e acondicionados em solução salina a 0,9% a 36 °C, em recipiente térmico, e posteriormente transportados até um laboratório de campo instalado em Guarapuava. No local, os ovários foram novamente higienizados, e os folículos com diâmetro entre 2 e 6 mm foram aspirados com agulha 18x3 mm acoplada a seringa de 10 mL.

O conteúdo folicular foi transferido para placas de Petri para busca, contagem e classificação dos oócitos com auxílio de estereomicroscópio (70x). Foram considerados viáveis os oócitos com membrana basal íntegra, múltiplas camadas de células da granulosa e ooplasma translúcido e homogêneo (Barros et al., 2020). Os COCs selecionados foram lavados em meio TCM-199 com Hepes, alocados

aleatoriamente em tubos com TCM-199 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco®), sob óleo mineral e atmosfera de 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂.

O transporte para Maringá (312 km) foi realizado em incubadora portátil (WTA, Sorocaba, São Paulo, a 38,5° C, com tempo médio de 4 horas. A maturação foi completada no mesmo ambiente, até totalizar 22 horas. Foram realizadas três coletas, totalizando 200 ovários e 224 COCs aspirados.

Fertilização in vitro (FIV)

Foram utilizadas palhetas de sêmen de carneiro da raça Texel, oriundas de um centro comercial de reprodução ovina no noroeste do Paraná. O sêmen foi descongelado em banho-maria a 36 °C por 30 segundos e submetido à técnica de capacitação espermática por gradiente de Percoll (4.000 rpm, 4 min). Após a seleção, os espermatozoides foram incubados por uma hora em meio FIV contendo penicilina, hipotaurina, epinefrina, heparina e 10% de SOE (FIV-SOE, grupo controle), obtido de ovelhas em estro do BIOTEC/UniCesumar; 0,1% (1 µL/mL) de P4 (FIV-P4, grupo teste), ([Albesa et al., 2022](#)). Após a incubação, os oócitos foram adicionados aleatoriamente às gotas de FIV, com concentração de 1x10⁶ espermatozoides/mL e 20 oócitos por gota, mantidos por 17 horas a 38,5 °C, sob 5% de CO₂ em ar.

Cultivo in vitro (CIV)

Após a fertilização, os zigotos com monocamada de células da granulosa foram cultivados em meio SOF suplementado com 2% de SFB, em incubadora com atmosfera de 5% CO₂, 5% N₂ e 90% O₂.

No 2º dia, foi avaliada a taxa de clivagem (nº de estruturas clivadas / nº de oócitos). No 4º dia, o meio foi renovado com adição de 10% de SFB e observou-se o estágio de desenvolvimento (2, 4 e 8 células).

No 7º dia, avaliou-se a taxa de blastocisto (nº de blastocistos grau I / nº de oócitos), considerando apenas embriões com qualidade boa ou excelente, conforme critérios da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões ([Stringfellow & Seidel, 1999](#)).

No 10º dia, foi avaliada a taxa de eclosão (nº de blastocistos eclodidos/nº de blastocistos grau I) ([Bueno & Paula, 2008](#); [Lustosa et al., 2018](#); [Mello et al., 2016](#)).

Análise dos dados

Os dados foram organizados em planilha eletrônica e as variáveis obtidas foram taxa de maturação (nº oócitos maduros/ nº oócitos), média de oócitos viáveis por ovelha, taxa de clivagem (nº de estruturas clivadas/ nº oócitos), taxa de blastocisto (nº de blastocistos grau I/ nº oócitos) e taxa de blastocistos eclodidos ou taxa de eclosão (nº blastocistos eclodidos/ nº blastocistos grau I). Todas as variáveis foram analisadas pelo procedimento PROC GENMOD do software Statistical Analysis System (SAS®, v.8.0, Cary, North Carolina) ([SAS, 2000](#)), versão 8.01, utilizando distribuição de Poisson e função de ligação identidade. Já as médias foram analisadas pelo método dos quadrados mínimos (Least Squares Means - LSM) que utiliza o teste de qui-quadrado de Wald.

Resultados e discussão

A taxa média de maturação dos oócitos foi de 68%, com uma média de oócitos viáveis por ovelha pré-púbere de 1,53. Esses achados estão de acordo com literatura, que aponta variações entre 60% e 80% de taxa de maturação para oócitos de cordeiras pré-púberes, dependendo das condições de transporte e cultivo ([Ferrer-Roda, et al., 2024](#); [Ptak et al., 2003](#); [Zhu et al., 2018](#)). Em relação ao transporte, infere-se que o transporte dos oócitos em solução salina por quatro horas demonstrou ser adequado, corroborando estudos anteriores que indicam a viabilidade dessa prática tanto em ovinos quanto em bovinos ([Max, 2011](#); [Pena et al. 2022](#); [Pontes et al., 2010](#)).

A taxa de clivagem dos zigotos foi significativamente maior ($P < 0,05$) para o grupo FIV-P4 (43,89% vs 26,66%) ([Tabela 1](#)). Esse aumento pode ser atribuído às propriedades únicas da P4 no meio de FIV, uma vez que a P4 atua como um agente regulador na capacitação espermática, promove a quimioatração e facilita a interação entre oócitos e espermatozoides, o que é fundamental para o sucesso da fecundação ([Gatica et al., 2013](#); [Li et al., 2018](#); [Suzuki & Fujinoki 2023](#)).

Tabela 1. Taxas de clivagem, de blastocisto e de blastocistos eclodidos oriundos de FIV contendo soro de ovelha em estro (FIV-SOE) ou progesterona (FIV-P4)

Parâmetro	FIV-SOE	FIV-P4	EPM*	Valor de p
2º dia				
Número de oócitos	25,00	26,00	8,64	0,9387
Número de estruturas clivadas	6,33	10,66	2,18	0,2336
Taxa de clivagem (%)	26,66	43,89	3,06	0,0165
7º dia				
Número de blastocisto grau I	3,00	5,66	0,84	0,0907
Taxa de blastocisto (%)	14,44	24,44	4,23	0,0170
10º dia				
Número de blastocisto eclodido	0,33	3,00	1,25	0,2051
Taxa de blastocisto eclodido (%)	11,11	50,00	19,34	0,0220

*Erro padrão da média.

Estudos prévios demonstram que a P4 é capaz de induzir o influxo de cálcio intracelular nos espermatozoides, ativando o canal CatSper, essencial para a motilidade hiperativada e a reação acrossômica ([Casao et al., 2017](#); [Li et al., 2018](#)). Esses processos tornam os espermatozoides mais aptos a atravessar a zona pelúcida do oócito, culminando em maiores taxas de fecundação.

Além disso, a P4 também desempenha um papel na estabilização do ambiente no meio de FIV, simulando e atuando de forma semelhante ao microambiente natural do oviduto, onde esse hormônio é liberado em altas concentrações periovulatórias ([Hafez & Hafez, 2004](#)). Essa regulação pode minimizar a ocorrência de alterações metabólicas que comprometam a funcionalidade espermática e a viabilidade oocitária ([García-Álvarez et al., 2015](#)).

Estudos também indicam que a P4 pode atuar indiretamente na modulação do metabolismo energético do espermatozoide, otimizando a utilização de reservas energéticas, o que é particularmente relevante durante o período de co-cultura com os oócitos ([Gimeno-Martos et al., 2018](#)). Assim, a P4 não apenas favorece o encontro entre os gametas, mas também contribui para sua eficiência funcional durante o processo de fertilização.

Por outro lado, a menor taxa de clivagem observada no grupo FIV-SOE pode estar relacionada à variabilidade intrínseca do SOE, que apresenta composições hormonais distintas dependendo da doadora e do momento do ciclo estral. Esse fator limita a utilização e padronização do SOE e pode impactar negativamente a interação gamética e o desenvolvimento inicial do embrião ([Rocha-Frigoni et al., 2014](#); [Romão et al., 2013](#)). O SOE também fornece uma fonte significativa de lipídios, que pode prejudicar a competência espermática ([Barrera et al., 2018](#)).

As taxas de blastocisto e de blastocistos eclodidos (taxa de eclosão) oriundos de FIV contendo soro de ovelha em estro (FIV-SOE) ou progesterona (FIV-P4) foram maiores para o grupo FIV-P4 ($P < 0,05$) ([Tabela 1](#)). A maior taxa de eclosão observada no grupo tratado com P4 (50%) em relação ao grupo SOE (11,11%), sugere que a P4 exerce um efeito modulador na fase de cultivo, promovendo a estabilidade necessária para o desenvolvimento embrionário avançado. Estudos sugerem que a suplementação com progesterona pode influenciar o metabolismo embrionário, possivelmente modulando vias associadas ao consumo de glicose e lactato, embora os mecanismos ainda não estejam completamente esclarecidos ([Hafez & Hafez, 2004](#); [Gimeno-Martos et al., 2018](#)).

Outro mecanismo potencialmente envolvido que pode ser considerado é a ação da P4 na modulação da expressão gênica dos embriões, que favorece a ativação de genes relacionados ao crescimento celular, a formação do blastocelo e a integridade estrutural do blastocisto ([Wrenzycki, 2016](#)). Esse efeito pode explicar o maior sucesso na eclosão dos blastocistos no grupo FIV-P4, uma etapa crítica para a viabilidade embrionária.

Esses achados são promissores e reforçam que a suplementação com P4 no meio de FIV pode superar as limitações associadas ao SOE, sendo uma possibilidade para padronizar protocolos de FIV em ovinos, resultando em protocolos de PIVE mais adequados e eficientes. A melhora dos resultados de PIVE, resulta em um aumento da produtividade animal, contribui com o manejo mais eficiente da ovinocultura e reduz o intervalo de tempo e os recursos para a obtenção de rebanhos com características genéticas

desejadas (Colombo et al., 2017; Fonseca et al., 2014). Além disso, reduz as inseminações e tratamentos hormonais, minimizando o uso de insumos e medicamentos veterinários.

No entanto, para a aplicação comercial dos protocolos de PIVE em ovinos, torna-se essencial que os resultados, especialmente a taxa de clivagem, sejam robustamente repetíveis e padronizados entre lotes e laboratórios. A variabilidade dos protocolos ainda limita a adoção em escala de campo, pois sistemas comerciais exigem consistência, eficiência e baixo custo por unidade produzida (Souza-Fabjan et al., 2023).

Paralelamente, é necessário que estudos futuros avaliem detalhadamente alterações morfológicas que ocorrem nos estágios mais tardios do desenvolvimento embrionário, como extrusões celulares, degeneração da zona pelúcida ou apoptose excessiva, que têm sido apontadas como fatores críticos de limitação em protocolos que utilizam SOE como suplemento (Romão et al., 2013). Adicionalmente, embora ainda haja lacunas, evidências sugerem que a P4 pode oferecer efeito protetor contra danos oxidativos ou metabólicos durante o cultivo embrionário, contribuindo para uma melhor integridade estrutural e qualidade embrionária (Wrenzycki, 2016).

Por fim, para validar o uso da P4 em escala, e considerar sua adoção prática em sistemas de produção, torna-se necessário investigar parâmetros tais como: diferentes concentrações de SOE e de P4 no meio de FIV; a combinação SOE + P4; as interações entre SOE/P4 com outros componentes do meio (por exemplo antioxidantes, lipídios, fatores de crescimento); bem como estudos de viabilidade econômica (custo por embrião, retorno genético, escala de produção) e de reprodutibilidade em campo.

Conclusões

Os resultados mostraram que a substituição de SOE por P4 no meio para a FIV aumenta a produção *in vitro* de embriões ovinos, melhorando, significativamente, as taxas de clivagem, de blastocisto e de blastocistos eclodidos.

Os dados evidenciam a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre o papel da P4 no desenvolvimento embrionário *in vitro*, especialmente em estágios mais avançados do desenvolvimento. A possibilidade de otimizar o cultivo embrionário com P4 representa um avanço significativo para a PIVE em ovinos, oferecendo alternativas mais práticas, econômicas e sustentáveis para a reprodução dessa espécie animal.

Financiamento

Este estudo foi fomentado, na forma de bolsa de estudo, pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- Albesa, M. B., Pe, R. P., & Jiménez, S. M. (2022). *Estudio de la activación del canal de calcio CatSper en espermatozoides ovinos*. Facultad de Ciencias y Universidad de Zaragoza.
- Barrera, N., Santos Neto, P. C., Cuadro, F., Bosolasco, D., Mulet, A. P., Crispo, M., & Menchaca, A. (2018). Impact of delipidated estrous sheep serum supplementation on *in vitro* maturation, cryotolerance and endoplasmic reticulum stress gene expression of sheep oocytes. *PLoS ONE*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198742>.
- Barros, V. R. P., Monte, A. P. O., Santos, J. M. S., Lins, T. L. B. G., Cavalcante, A. Y. P., Gouveia, B. B., Müller, M. C., Oliveira Junior, J. L., Barberino, R. S., Donfack, N. J., Araújo, V. R., & Matos, M. H. T. (2020). Effects of melatonin on the *in vitro* growth of early antral follicles and maturation of ovine oocytes. *Domestic Animal Endocrinology*, 71, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2019.106386>.
- Baruselli, P. S., Abreu, L. Â., Catussi, B. L. C., Santos, G. F. F., Factor, L., Felisbino, A. R., Frigoni, F. G., & Crepaldi, G. A. (2021). Mitos e realidades sobre a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 45(4). <https://doi.org/10.21451/1809-3000.rbra2021.083>.

- Basso, C. A., Martins, J. F. P., Ferreira, C. R., Ereno, A., Tannura, J., Tabet, A., Figueiredo, C. L., Oliveira, P. C., & Pontes, J. H. F. (2008). Produção *in vitro* de embriões ovinos: Aspectos da técnica de aspiração folicular e do tratamento hormonal de doadoras. *O Embrião*, 38, 8–11.
- Bernardi, M. L. (2018). Produção *in vitro* de embriões ovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33(1). <https://doi.org/10.22456/1679-9216.14418>.
- Bernećić, N. C., Graaf, S. P., Leahy, T., & Gadella, B. M. (2021). HDL mediates reverse cholesterol transport from ram spermatozoa and induces hyperactivated motility. *Biology of Reproduction*, 104(6). <https://doi.org/10.1093/biolre/ioab035>.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Brasil amplia exportação de material genético animal para o Paraguai. Nota conjunta MAPA-MRE, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/brasil-amplia-exportacao-de-material-genetico-animal-para-o-paraguai>, acesso em 06 de julho de 2025.
- Bueno, A. P., & Paula, B. M. (2008). Produção *in vitro* de embriões bovinos. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 6(11), 1–7.
- Casao, A., Gimene-Martos, S., Abecia, J. A., Cebrian-Pérez, J. A., Muiño-Blanco, T., & Pérez-Pé, R. (2017). 17- β -Estradiol and progesterone effect on ram sperm capacitation and fertilizing ability. *XVII Jornadas Sobre Producción Animal de La Asociación Interprofesional Por El Desarrollo Animal (AIDA)*. <https://doi.org/10.5380/avs.v22i1.50814>.
- Castilho, C., Almeida, M. F., Costa, M. Z., Cesare, Â. G., & Gabriel Filho, L. R. A. (2013). Protocolos de indução e sincronização do estro em ovelhas. *Ciência Animal Brasileira*, 14(1), 91–97.
- Colombo, A. H. B., Cavalieri, F. L. B., Andreazzi, M. A., Moreski, D. A. B., Botelho, A. C. F. A., & Santos, J. M. G. (2017). Evaluation of biotechnics of reproduction under the environmental focus. *Archives of Veterinary Science*, 22(1), 81–89.
- Emiliozzi, C., Cordonier, H., Guérin, J. F., Ciapa, B., Benchaïb, M., & Fénichel, P. (1996). Effects of progesterone on human spermatozoa prepared for in-vitro fertilization. *International Journal of Andrology*, 19(1), 39–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1996.tb00433.x>.
- Falchi, L., Ledda, S., & Zedda, M. T. (2022). Embryo biotechnologies in sheep: Achievements and new improvements. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(S5), 22–33. <https://doi.org/10.1111/rda.14127>.
- Ferrer-Roda, M., Izquierdo, D., Gil, A., Oliveira, M. E. F., & Paramio, M.-T. (2024). Oocyte competence of prepubertal sheep and goat oocytes: An assessment of large-scale chromatin configuration and epidermal growth factor receptor expression in oocytes and cumulus cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8), 4474. <https://doi.org/10.3390/ijms25084474>
- Fonseca, J. F., Cruz, R. C., Oliveira, M. E. F., Souza-Fabjan, J. M. G., & Viana, J. H. M. (2014). Biotecnologias aplicadas à reprodução de ovinos e caprinos. *EMBRAPA*, 1(1).
- Fonseca, J. F., Souza-Fabjan, J. M. G., Oliveira, M. E. F., Leite, C. R., Nascimento-Penido, P. M. P., Brandão, F. Z., & Lehloenya, K. C. (2016). Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, 86(1), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.025>.
- García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Jiménez-Rabadán, P., Ramón, M., Olmo, E., Iniesta-Cuerda, M., Anel-López, L., Fernández-Santos, M. R., Garde, J. J., & Soler, A. J. (2015). Effect of different media additives on capacitation of frozen-thawed ram spermatozoa as a potential replacement for estrous sheep serum. *Theriogenology*, 84(6), 948–955. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.032>.
- Gatica, L. V., Guidobaldi, H. A., Montesinos, M. M., Teves, M. E., Moreno, A. I., Uñates, D. R., Molina, R. I., & Giojalas, L. C. (2013). Picomolar gradients of progesterone select functional human sperm even in subfertile samples. *Molecular Human Reproduction*, 19(9), 559–569. <https://doi.org/10.1093/molehr/gat037>.
- Gimeno-Martos, S., Casao, A., Yeste, M., Cebrián-Pérez, J. A., Muiño-Blanco, T., & Pérez-Pé, R. (2019). Melatonin reduces cAMP-stimulated capacitation of ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(2), 420. <https://doi.org/10.1071/RD18087>.

- Granleese, T., Clark, S. A., Kinghorn, B. P., & van der Werf, J. H. J. (2019). Optimizing female allocation to reproductive technologies considering merit, inbreeding and cost in nucleus breeding programmes with genomic selection. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 136(2). <https://doi.org/10.1111/jbg.12374>.
- Hafez, B., & Hafez, E. S. E. (2004). *Reprodução Animal* (Vol. 1, p. 513). Manole: São Paulo, Brasil.
- Li, K., Li, R., Ni, Y., Sun, P., Liu, Y., Zhang, D., & Huang, H. (2018). Novel distance-progesterone-combined selection approach improves human sperm quality. *Journal of Translational Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1575-7>.
- Lustosa, A. A., Barboza, N. A., Barbosa, Y. G. S., Rodrigues, P. K. O., & Magalhães Neto, F. C. R. (2018). Aspectos relevantes na produção comercial de embriões bovinos por meio da técnica biotecnológica de fertilização *in vitro*: Revisão. *PUBVET*, 12(3), 1–6. <https://doi.org/10.22256/pubvet.v12n3a51.1-6>.
- Max, M. C. (2011). *Produção in vitro de embriões na espécie ovina: efeito do benzoato de estradiol na aspiração folicular e transporte de gametas e embriões em longas distâncias*. Universidade Estadual de Londrina.
- Mello, R., Ferreira, J., Sousa, S., Mello, M., & Palhano, H. (2016). Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 40(2).
- Pena, A. S., Cavalheiro, B. L., Maffi, M. M., Riani, E., & Longo, S. (2022). *Cellular and molecular events that occur in the oocyte during prolonged ovarian storage in sheep*. *Animals*, 10(12), 2414. <https://doi.org/10.3390/ani10122414>
- Pontes, J. H. F., Silva, K. C. F., Basso, A. C., Rigo, A. G., Ferreira, C. R., Santos, G. M. G., Sanches, B. V., Porcionato, J. P. F., Vieira, P. H. S., Faifer, F. S., Sterza, F. A. M., Schenk, J. L., & Seneda, M. M. (2010). Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*, 74(8), 1349–1355. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.004>.
- Ptak, G., Tischner, M., Bernabò, N., & Loi, P. (2003). Donor-dependent developmental competence of oocytes from lambs subjected to repeated hormonal stimulation. *Biology of Reproduction*, 69(1), 278–285. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.011312>.
- Rocha-Frigoni, N. A. S., Leão, B. C. S., Feliciano, M. A. R., Vicente, W. R. R., & Oliveira, M. E. F. (2014). Produção *in vitro* de embriões ovinos: Avanços e desafios. *Revista Brasileira de Produção Animal*, 38(2), 103109.
- Romão, R., Marques, C. C., Baptista, M. C., Vasques, M. I., Barbas, J. P., Horta, A. E. M., Carolino, N., Bettencourt, E., Plancha, C., Rodrigues, P., & Pereira, R. M. (2013). Evaluation of two methods of *in vitro* production of ovine embryos using fresh or cryopreserved semen. *Small Ruminant Research*, 110(1), 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.029>.
- Sánchez-Ajofrín, I., Peris-Frau, P., García-Álvarez, O., Fernández-Santos, M. R., Montoro, V., Garde, J. J., & Soler, A. J. (2022). Serum supplementation during *in vitro* fertilization of sheep oocytes influences blastocyst quality through the differential abundance of mRNA transcripts. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(Suppl 5), 68–71. <https://doi.org/10.1111/rda.14161>
- Santos, F. C. C., & Barcelos, R. A. D. (2012). Eficiência de protocolos de sincronização de estro em ovelhas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 36(3), 202–205.
- SAS® - Statistical Analysis System. OnDemand for Academics, 2024 (on-line).
- Simplicio, A. A., Freitas, V. J. F., & Fonseca, J. F. (2007). Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31(2), 234–246.
- Souza-Fabjan, J. M. G., Leal, G. R., Monteiro, C. A. S., Batista, R. I. T. P., Barbosa, N. O., & Freitas, V. J. F. (2023). *In vitro* embryo production in small ruminants: what is still missing? *Animal Reproduction*, 20(3), e20230055. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2023-0055>.
- Stringfellow, D. A. & Seidel, S. M. (1999). Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3.ed. [S.l.]: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 180p.

- Suzuki, R. & Fujinoki, M. (2023). Progesterone increases the success of *in vitro* fertilization via enhanced sperm hyperactivation in mice. *Journal of Reproduction and Development*, 69(3), 147-153. <https://doi.org/10.1262/jrd.2022-114>
- Takada, L., Bicudo, S. D., Rodrigues, C. F. C., Coelho, L. A., & Perri, S. H. V. (2009). Sincronização do estro e da ovulação utilizando protocolos de curta duração durante a pré-estação reprodutiva em ovelhas Suffolk. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 31(4), 453–460.
- Traldi, A. S. (2009). Produção *in vitro* de embriões de ovinos: Uma visão crítica do método e de seu resultado a campo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1590/S1516-35982009001300030>.
- Wrenzycki, C. (2016). Sistemas de cultivo *in vitro*: quão longe estamos das condições ideais? *Anais Da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, 155–159.
- Zhu, J., Moawad, A. R., Wang, C. Y., Li, H. F., Ren, J. Y., & Dai, Y. F. (2018). Advances in *in vitro* production of sheep embryos. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.02.003>.

Histórico do artigo:**Recebido:** 28 de agosto de 2025**Aprovado:** 6 de outubro de 2025**Licenciamento:** Este artigo é publicado na modalidade Acesso Aberto sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 (CC-BY 4.0), a qual permite uso irrestrito, distribuição, reprodução em qualquer meio, desde que o autor e a fonte sejam devidamente creditados.