



## O que fará a PIV de suínos chegar ao uso comercial?

*What will make swine IVP come to commercial use?*

**Mariana Groke Marques<sup>1,2\*</sup>, Ricardo Zanella<sup>3,4,5</sup>**

<sup>1</sup>Embrapa Suínos e Aves, BR153, km 110, Concórdia - SC, 89715-899 Brasil

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Sanidade Animal, Instituto Federal Catarinense, Concórdia, SC, Brasil

<sup>3</sup>Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Curso de Medicina Veterinária,  
Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil

<sup>4</sup>Faculdade de Medicina, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil

<sup>5</sup>Programa de Pós-graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil

### Introdução

Na suinocultura, a IA artificial é a biotécnica reprodutiva mais utilizada mundialmente, sendo ela uma das grandes responsáveis pelo progresso genético obtido nesta espécie. No Brasil, no ano de 2019, estimou-se que mais de 94% das fêmeas suínas comerciais utilizaram desta biotécnica (VIANA et al., 2020). A alta disseminação em seu uso se dá principalmente pela capacidade de rápida disponibilidade de material genético dos reprodutores e na facilidade na realização deste procedimento. No entanto, o melhoramento genético com o uso da IA representa somente 50% dos ganhos genéticos oriundos do gameta masculino (BOURDON, 1999).

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotécnica de reprodução assistida que foi desenvolvida para potencializar a disseminação do potencial genético da fêmea. Apesar da possibilidade de aplicação em várias espécies, na atualidade, comercialmente em larga escala, ela é utilizada apenas na espécie bovina. Na espécie humana, ela pode ser uma alternativa para casais que desejam ter filhos, mas que apresentam alguma falha reprodutiva

Na espécie suína, assim como em outras espécies, a PIV tem sido utilizada basicamente em pesquisas, para o aprimoramento dos conhecimentos em fisiologia da maturação oocitária, fecundação, cultivo e desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação. Além disso, os ovários e oócitos suínos também pode ser utilizado para treinamento de profissionais de laboratório que irão atuar em técnicas de reprodução assistida em humanos (Braga et al., 2007). Os embriões de suínos produzidos *in vitro* podem ser utilizados como modelo para desenvolvimento de meios e sistemas de cultivos mais eficientes para o desenvolvimento de embriões humanos (Mordhorst; Prather, 2017).

A PIV em suínos também é um instrumento de suporte para outras biotécnicas como clonagem, transgênese e transferência nuclear. Pode-se citar como exemplo a produção de embriões editados geneticamente. Atualmente, a grande maioria dos estudos que produzem suínos editados geneticamente utilizam-se da técnica de transferência nuclear associada à transfecção de células somáticas. Para que se tenha sucesso, e a decorrente produção dos animais editados, é fundamental o domínio de etapas da PIV como a maturação oocitária, ativação e cultivo embrionário.

Além de todas as utilizações citadas acima, o uso desta ferramenta tem uma grande potencialidade para sua utilização comercial na suinocultura, principalmente em dois principais pontos: na seleção de machos, evitando-se assim a disseminação de material genético de machos subfêrteis e na produção de embriões sexados para disseminação de genética entre granjas núcleo e granjas multiplicadoras (estes pontos serão melhores abordados no item 2).

### A produção de embriões suínos *in vitro*

A maturação oocitária é considerada uma das fases mais importantes do processo de produção *in vitro* de embriões, pois é neste período que o oócito além de sofrer modificações nucleares (maturação nuclear) passa por mudanças bioquímicas, estruturais e citoesqueléticas (maturação citoplasmática) que serão responsáveis e essenciais para o desenvolvimento inicial do embrião após a fecundação.

Para pesquisa, a obtenção dos oócitos é realizada de ovários oriundos de abatedouro. Estudos foram desenvolvidos para otimizar o número e qualidade dos oócitos obtidos, sendo a metodologia de aspiração folicular com agulha 18G acoplada a seringa a que obteve oócitos com maior capacidade em se tornarem blastocistos após a fecundação *in vitro* (Marques et al., 2015). Outro ponto importante a ser salientado é a taxa de recuperação de oócitos e as taxas de maturação de acordo com a categoria animal

\*Correspondência: mariana.marques@embrapa.br

Recebido: 27 de outubro de 2021

Aceito: 28 de dezembro de 2021



da doadora. Braga et al., (2019) demonstraram que a taxa de recuperação por ovário e os índices de oócitos que alcançaram Metáfase II após o processo de maturação *in vitro* foram maiores em fêmeas cíclicas (que apresentavam corpo lúteo no ovário) do que em fêmeas pré-púberes, como demonstrado na figura 1.

Quando se utilizam oócitos provenientes de fêmeas pré-púberes, a adição ao meio, principalmente na primeira metade do tempo de maturação, de substâncias que mantenha altos níveis de cAMP nos oócitos como o dbcAMP melhoram substancialmente os resultados de maturação (Appeltant et al., 2016).

Tabela 1. recuperação oocitária e percentagem de maturação nuclear de oocitos de fêmeas púberes e pré púberes

	Ovários (N)	Oócitos Recuperados (N)	Oócito/ovário (N)	Oócitos que passaram pela MIV (N)	MII (N)	% de M II
Pré-púbere	1101	1427	1,29 <sup>a</sup>	783	596	76,12% <sup>a</sup>
Cíclica	742	1883	2,53 <sup>b</sup>	972	909	93,52% <sup>b</sup>

a,b Diferenças significativas entre os grupos (P<0.001)

O procedimento de maturação *in vitro* na espécie suína demora cerca de 40 a 44 horas. Estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a utilização de TCM199 suplementado com 10% de fluido folicular suíno; 3,05mM de glicose, 0,91mM piruvato de sódio, 50IU/ml de gentamicina; 0,57mM cisteína e 10ng EGF/ml foi o meio de maturação bastante eficiente e que a adição de 10UI hCG/ml e 10UI eCG/ml somente nas primeiras 22 horas, apresentou os melhores resultados em termos de oócitos que alcançaram Metáfase 2 após 44 horas de cultivo (Marques et al., 2007).

Para fecundação *in vitro* (FIV), apesar dos vários protocolos desenvolvidos, não há ainda um consenso em relação ao tempo, meios e procedimentos para realização da fecundação. O principal desafio é alcançar altos índices de embriões monospérmicos sem a diminuição das taxas de blastocistos. Neste aspecto, a espécie suína apresenta dois problemas que precisam ser resolvidos: diminuição dos altos índices de polispermia e melhoria dos índices e qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro*, quando comparadas aos *in vivo* (Gil et al., 2004).

A principal razão da ocorrência da polispermia parece ser a alta concentração de espermatozoides no local da FIV, juntamente com a falta do efeito da regulação do aparelho reprodutor feminino para controlar a quantidade e a qualidade dos espermatozoides no local de fertilização (Funahashi, 2003).

Entre os meios mais usados para FIV suína, pode-se citar o meio tamponado com Tris modificado (mTBM), o meio de cultura TCM199 e o meio Tyrode lactato - piruvato - albumina (TALP) (Romar; Funahashi; Coy, 2016). Atualmente já existem empresas que comercializam meios para esta finalidade.

No que tange os procedimentos para realização da FIV, a centrifugação em gradiente de Percoll® ou camada única de coloide parece ser uma forma adequada para separar os espermatozoides móveis de suínos (Romar; Funahashi; Coy, 2016), principalmente no caso do sêmen congelado. Para sêmen fresco ou resfriado, que apresentam maiores índices de espermatozoides viáveis, não seria necessária a separação por gradientes, apenas faz-se a centrifugação para retirada do diluidor, seguido de lavagem e suspensão na dose inseminante em meio de fecundação.

Quanto a presença ou não das células do cumulus e tempo de incubação a literatura mostra resultados bastante variáveis. Utilizamos na nossa rotina de fecundação *in vitro* a retirada das células do cumulus, mas sem que os oócitos fiquem totalmente desnudos, evitando assim o excesso de pipetagem que pode danificar os oócitos. A FIV é realizada em meio mTBM, sendo os oócitos e os espermatozoides (dose inseminante  $5 \times 10^5$  espermatozoides/ml) mantidos em incubação por 30 minutos. Após este período, os oócitos juntamente com os espermatozoides aderidos a estes ou em sua periferia são colocados em uma nova gota contendo apenas meio de FIV, onde permanecerão incubados (38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar e alta umidade) por mais 5,5 horas (Marques et al., 2012). Este protocolo foi capaz de



produzir zigotos com média 45% de monoespermia, considerado um resultado condizente com as taxas apresentadas na literatura.

Segundo Romar et al., (2019) novos protocolos que se aproximem mais das alterações fisiológicas que ocorrem neste período incluindo a indução do endurecimento da zona pelúcida por incubação com meio que contenham fluido oviductal, preparação dos espermatozoides com meio de alta viscosidade pela adição de moléculas inertes ou biofluidos reprodutivos e a incorporação de Dispositivos 3D estão sendo desenvolvidos.

Neste sentido, estudos como o de Soriano-Úbeda et al., (2017) propuseram um protocolo alternativo com o intuito foi mimetizar o ambiente periovulatório do oviduto *in vivo*, combinando meios com componentes ovidutais e barreiras físicas, tendo tido boa eficiência em reduzir a polispermia. No entanto, introduz fatores ainda não totalmente definidos ao meio, o que diminui a possibilidade de replicabilidade do protocolo.

Para o cultivo embrionário, o meio de cultivo NCSU23 é o mais comumente utilizado para a produção *in vitro* de embriões em suínos. Também são muito utilizados o meio de cultivo desenvolvido por Yoshioka et al., (2002) o meio PZM3 (Porcine Zygote Medium) e suas formulações subsequentes (PZM4 e 5) que são baseados na composição do fluido do oviduto de suínos, suplementado com aminoácidos, podendo ser uma alternativa para o desenvolvimento de embriões até o estágio de blastocisto.

Após o término da FIV, o restante das células do cumulus e espermatozoides são retirados e os presumíveis zigotos lavados e incubados nos meios de cultivo por 7 dias. No terceiro dia de desenvolvimento é avaliada a clivagem e adicionado meio de cultivo às gotas. A avaliação de blastocistos é feita nos dias 5 e 7 do desenvolvimento.

Os protocolos usados no cultivo *in vitro* na espécie suína mostram variação entre os laboratórios, incluído diferentes atmosferas (5 ou 20% de O<sub>2</sub>), diferentes meios, adição de antioxidantes, uso de soro fetal bovino, uso de co-cultivo com células somáticas entre outros, sendo um desafio a comparação das metodologias bem como a repetibilidade de protocolos. Após o desenvolvimento de vários protocolos de PIV por diferentes grupos de pesquisa, os índices de embriões que atingem o estágio de blastocisto são em média de 20 a 30%.

### Aplicações comerciais da PIV em suínos

Vislumbramos duas possibilidades de aplicação comercial para PIV em suínos. Em primeiro, e acreditamos que possa ter sua aplicação em menor espaço de tempo, é a seleção de machos reprodutores, principalmente no que diz respeito a identificação de machos subfêrteis.

Atualmente na suinocultura brasileira foram estruturadas as Unidade de Difusão Genética (UDG). Assim ficaram conhecidas as Centrais de Inseminação Artificial (CIA) mais especializadas, onde estão alojados sempre os reprodutores do topo da pirâmide genética e que possuem tecnologia avançada, produzindo as doses sob rígidos controles de qualidade e biossegurança (Alkmin, 2019). Porém, as avaliações rotineiras de qualidade espermática, que são importantes para garantir a produção de doses inseminantes com padrão de qualidade, atendendo as normativas, podem não trazer dados suficientes para predição da fertilidade ou potencial reprodutivo. Diferenças mínimas na fertilidade entre os reprodutores podem levar a uma menor eficiência na produção de leitões e, conseqüentemente perdas econômicas (Malaga et al., 2021).

É sabido que na espécie suína há grande variação nas taxas de polispermia e produção de embriões entre machos. Esta variação, dependendo do protocolo de FIV utilizado pode ser utilizada como ferramenta para identificação de machos com maior potencial reprodutivo.

Ruiz-Sánchez et al., (2006) utilizando um modelo de regressão múltipla incluindo fatores como: baixo números de espermatozoides para IA, determinação da taxa de prenhez no dia 30, motilidade do sêmen após 7 e 10 dias e parâmetros específicos de FIV foram úteis para identificar cachaaços com baixa fertilidade existentes em centrais comerciais.

Ensaio adaptados de FIV como o ensaio de penetração de esperma, ou ensaio de penetração de oócito de hamster zona-livre, medem a capacidade dos espermatozoides de sofrer capacitação, reação acrossômica, fusão e penetração através do oolema e desidensação dentro do citoplasma de um oócito, sendo uma das medidas mais sensíveis da função espermática disponíveis (Aitken, 2006).

O ensaio homólogo de penetração *in vitro* (hIVP) tem se mostrado uma boa ferramenta para avaliar a capacidade de fertilização do sêmen de fresco e resfriado. Como há a possibilidade de utilização de oócitos no estágio de vesícula germinativa (GV) neste ensaio, otimiza-se a coleta de gametas



femininos, encurtando assim o tempo necessário para o ensaio, economizando tempo gasto na conclusão da maturação *in vitro* (Matás et al., 1996).

Gadea (2005) relatou que em sua experiência com sistemas de fertilização *in vitro*, a taxa de penetração foi mantida nos melhores modelos de regressão logística relacionados à fertilidade e foi significativamente correlacionada com o tamanho da leitegada.

Diante do exposto podemos verificar que há bastante literatura sobre o assunto, e protocolos com boa eficiência, mas ainda não há, no Brasil, laboratório comercial que ofereça este tipo de serviço, faltando assim a transferência desta tecnologia e sua aplicação direta ao sistema produtivo. Podemos inferir que faltam meios comerciais e mão de obra especializada para tal.

O segundo ponto que podemos ressaltar como aplicação da PIV na suinocultura seria na produção de animais de reposição nas granjas núcleo minimizando assim os riscos sanitários com a introdução de animais oriundos de outros rebanhos, podendo ser uma importante ferramenta para a implementação de programas de biosegurança, tanto entre granjas núcleo e multiplicadoras quanto para impoção de material genético via embriões.

Outro ponto bastante importante está relacionado com a baixa quantidade de espermatozoides utilizados para a realização da PIV, possibilitando assim a realização da sexagem espermática e consequentemente maximizando a produção de animais de linhas macho e linhas fêmea a um custo reduzido.

### **Pontos a serem superados para aplicações comerciais**

No que diz respeito a seleção de machos, como dito anteriormente, há a necessidade de aprimoramento dos protocolos de fecundação *in vitro* visando esta finalidade e não somente a produção de embriões.

Para a aplicação na produção de embriões, tem-se dois pontos críticos: a coleta de oócitos *in vivo* e a transferência dos embriões produzidos para as receptoras.

A coleta de oócitos provenientes de ovários de abatedouro já está padronizada, no entanto, como as fêmeas abatidas geralmente são animais oriundos de cruzamentos terminais isto acaba gerando a produção de leitões com baixo valor genético agregado. Assim, é necessário a padronização de técnicas nas quais possam ser obtidos oócitos provenientes de fêmeas de alto mérito genético, sem que seja necessário o abate dos animais, ou seja que a coleta possa ser feita *in vivo*.

Dentre as possíveis técnicas, a OPU (Ovarian puncture or PICK-UP) que consiste na remoção transvaginal dos oócitos por aspiração dos folículos ovarianos com o auxílio de uma sonda de ultrassom, tende a ser a mais promissora pela sua facilidade de aplicação em condições de campo. A OPU (Ovarian puncture or PICK-UP), foi inicialmente desenvolvida para coletar oócitos em humanos e na bovinocultura, a sua aplicação em escala comercial se tornou viável.

Um dos desafios na utilização da OPU em suínos está no baixo número de cumulus-oocytes complexes (COCs) recuperados de fêmeas suínas, quando comparados com os COC coletados de ovários de fêmeas oriundas de abatedouros (Ferguson et al., 2013). A baixa taxa de recuperação pode estar associada a vários fatores, tanto individuais de cada animal, incluindo o dia do ciclo estral e o pré-tratamento, como fatores relacionados com a coleta, como a correta calibração da pressão a vácuo para a aspiração dos folículos e a experiência do operador (BRÜSSOW et al., 1997).

Mas é possível sim a obtenção de COCs oriundos da aspiração. Estudo recente de Yoshioka et al., (2020) utilizou com sucesso a OPU guiada por ultrassom transvaginal para coleta de oócitos em suínos obtendo maior número de estruturas com 100 mmHg do que com 80 mmHg ( $21,2 \pm 6,5$  e  $13 \pm 5,5$  oócitos por aspiração, respectivamente), no entanto, não houve diferenças significativas na população de oócitos agrupados por critérios morfológicos, número de blastocistos por sessão e o número total de células em blastocistos. Estes oócitos foram fecundados *in vitro* e os embriões transferidos geraram leitões viáveis, iniciando assim a possibilidade de implementação da técnica posteriormente de forma comercial.

O outro aspecto a ser superado para que a produção *in vitro* possa atingir a aplicação comercial é o desenvolvimento de técnicas simples e rápidas para a transferência dos embriões produzidos. A transferência de embriões é pré-requisito geral para a aplicação prática de técnicas reprodutivas *in vitro*, uma vez que os embriões produzidos por PIV ou outras biotecnologias como a clonagem e transgenia necessitam de um protocolo eficiente de transferência para as receptoras (Brüssow et al., 2018).

Focando na metodologia de transferência de embriões para as receptoras, as primeiras transferências cirúrgicas de embriões em suínos datam de 1951, resultando no nascimento de 4 leitões



oriundos de 9 embriões inovulados (Kvasnitski, 2001). Em 1962, Hancock e Hovell, (1962) obtiveram 50% de taxa de prenhes em porcas, com uma média de 10,3 leitões nascidos por porca de 14 embriões na média inovulados cirurgicamente em cada uma. No ano de 1970, Wrathall et al., (1970), realizaram o primeiro transporte e inovulação de embriões suínos de forma cirurgica entre diferentes continentes, obtendo o nascimento de três leitões vivos de 34 embriões inovulados.

No entanto, para a aplicação comercial existe a necessidade da busca de protocolos menos invasivos e de maior praticidade. Assim, vários pesquisadores tem focado seus estudos no desenvolvimento de técnicas de transferências não cirurgicas ou por leparoscopia. Neste sentido, existem barreiras, principalmente anatomicas, formato e tamanho da cérvix das fêmeas e os longos cornos uterinos, que dificultam a aplicabilidade da técnica.

Vários grupos descreveram o nascimento de leitões oriundos de transferência de forma não cirurgica com uso de cateter para deposição dos embriões pós cervical (Reichenbach; Modl; Brem, 1993; Galvin; Killian; Stewart, 1994; LI et al., 1996). Apesar de inicialmente promissora, a taxa de prenhez foi em média de 40 % e tamanho de leitegadas > 7 (Hazeleger et al., 1994).

Martinez et al., (2013) com o uso da técnica de transferência de embriões intra uterina profunda (corno uterino) com o uso de um endoscópio com fibra optica, para a deposição dos embriões na região mais próxima da fisiologia possível, obtiveram sucesso na transferência de embriões de 80%, com leitegadas superiores a 9,5 leitões no entanto um dos limitantes desta técnica ainda está na dificuldade em passar a cervix das fêmeas e atingir o ponto exato para a deposição dos embriões (taxa de sucesso de 70% em leitões e 80% em porcas).

Uma alternativa está na adaptação das técnicas de TE em ovinos para suínos. O uso da transferência de embriões de forma laparoscópica ou semi laparoscópica, é um procedimento minimamente invasivo, que permite que 100% das fêmeas sejam inovuladas em um curto espaço de tempo e a deposição dos embriões ocorre próximo aos ovidutos. Para tanto as fêmeas necessitam estar sob anestesia geral, e colocadas em decúbito dorsal para a realização deste procedimento (ZHENG et al., 2016). Usando a técnica de TE por laparoscopia, foi possível obter uma média de 9,5 leitões por porca, mostrando ser uma alternativa viável para ser utilizada na rotina para a produção de animais geneticamente superiores (Wieczorek et al., 2015). Esta técnica é promissora uma vez tem bom resultados, sendo de execução rápida e tendo resultados equivalentes aos da transferência cirurgica. Necesita-se agora de treinamento dos profissionais para realização da mesma.

### Conclusão

O uso das biotecnologias reprodutivas tem possibilitado um impacto direto nos programas de melhoramento genético animal, em decorrência da facilidade de disseminação de material genético de indivíduos melhoradores, consequentemente aumentando a produtividade. A PIV por sua vez abre oportunidades para implementar ainda mais os ganhos principalmente por permitir a inclusão de dados relacionados a performance das fêmeas. Além disso, esta ferramenta poderá ser utilizada na seleção de machos subfêrteis, colaborando na predição do potencial reprodutivo, evitando prejuízos aos produtores. No entanto, alguns desafios ainda precisam ser superados para a aplicação desta biotécnica de forma comercial na suinocultura, principalmente, no que tange a adaptação de protocolos utilizados para pesquisa para o uso comercial, otimizando gargalos como a coleta dos oócitos *in vivo* e transferência dos embriões produzidos.

### Referências

- Aitken RJ.** Sperm function tests and fertility. *International Journal of Andrology*, v. 29, n. 1, fev. 2006.
- Alkmin DV.** Central de IA em suínos: Uma análise prática do processo de produção de sêmen de alta qualidade. 2019. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.43, n.2, p.327-330, abr./jun. 2019
- Appeltant R et al.** Porcine oocyte maturation in vitro: role of cAMP and oocyte-secreted factors – A practical approach. *Journal of Reproduction and Development*, v. 62, n. 5, p. 439–449, 2016. Disponível em: <[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/62/5/62\\_2016-016/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/62/5/62_2016-016/_article)>.
- Braga TF et al.** The dynamics of gene expression, lipid composition and DNA methylation reprogramming are different during in vitro maturation of pig oocytes obtained from prepubertal gilts and cycling sows. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 54, n. 9, p. 1217–1229, 19 set. 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.13501>>.



- Bourdon RM.** Understanding animal Breeding, Pearson Education (US). Upper Saddle River, NJ, United States. 2nd edition. 1999.
- Brüssow KP et al.** Ovum pick up in swine: the influence of aspiration vacuum pressure on oocyte recovery from preovulatory follicles. *Acta veterinaria Hungarica*, v. 45, n. 2, p. 189–96, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9270141>>. Acesso em: 25 out. 2021.
- Brüssow KP et al.** Embryo transfer in swine – an indispensable key for the application of reproductive techniques. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, v. 21, n. 3, 30 set. 2018. Disponível em: <<http://www.ejpau.media.pl/volume21/issue3/art-03.html>>.
- De Almeida Ferreira Braga, DP et al.** Use of pig oocytes for training new professionals in human assisted reproduction laboratories. *Fertility and Sterility*, v. 88, n. 5, p. 1408–1412, nov. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028207001276>>.
- Ferguson E et al.** Development of a Chute to Facilitate Transvaginal Ultrasound Guided Oocyte Aspiration (TUGA) in the Sow. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 75, n. 2, 2013.
- Funahashi H.** Polyspermic penetration in porcine IVM-IVF systems. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 15, n. 3–4, p. 167–177, 2003.
- Gadea J.** Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, v. 63, n. 2, p. 431–444, 15 jan. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X04003127>>.
- Galvin JM, Killian DB, Stewart ANV.** A procedure for successful nonsurgical embryo transfer in swine. *Theriogenology*, v. 41, n. 6, jan. 1994.
- Gil MA et al.** Effect of short periods of sperm-oocyte coinubation during in vitro fertilization on embryo development in pigs. *Theriogenology*, v. 62, n. 3–4, p. 544–552, 2004.
- Hancock JL, Hovell GJR.** EGG transfer in the sow. *Journal of reproduction and fertility*, v. 4, n. 1, p. 195–201, 1962.
- Hazeleger W et al.** Transcervical Embryo Collection and Reproductive Performance of Sows with Resectioned Uteri. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 29, n. 1, fev. 1994.
- Kvasnitski AV.** Research on interbreed ova transfer in pigs. *Theriogenology*, v. 56, n. 8, nov. 2001.
- LI J et al.** Technical note: porcine non-surgical embryo transfer. *Journal of Animal Science*, v. 74, n. 9, 1996.
- Málaga FC et al.** Como identificar machos suínos subférteis? *Suinocultura Industrial*, v. 300, n. 03, p. 14–16, 2021.
- Marques M et al.** Effect of Low Oxygen Tension Atmosphere and Maturation Media Supplementation on Nuclear Maturation, Cortical Granules Migration and Sperm Penetration in Swine In Vitro Fertilization. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, n. 3, p. 491–497, jun. 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2011.01909.x>>.
- Marques MG et al.** In vitro maturation of pig oocytes with different media, hormone and meiosis inhibitors. *Animal Reproduction Science*, v. 97, n. 3–4, p. 375–381, fev. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378432006000546>>.
- Marques MG et al.** Effect of Oocyte Recovery Techniques on in Vitro Production of Swine Embryos. *Open Journal of Animal Sciences*, v. 05, n. 04, p. 467–473, 2015. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/ojas.2015.54048>>.
- Martinez EA et al.** Design, development, and application of a non-surgical deep uterine embryo transfer technique in pigs. *Animal Frontiers*, v. 3, n. 4, 1 out. 2013.
- Matás C et al.** In vitro penetration assay of boar sperm fertility: Effect of various factors on the penetrability of immature pig oocytes. *Theriogenology*, v. 46, n. 3, ago. 1996.
- Mordhorst BR, Prather RS.** Pig Models of Reproduction. In: *Animal Models and Human Reproduction*. Hoboken NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017. p. 213–234.
- Reichenbach H, Modl J, Brem G.** Piglets born after transcervical transfer of embryos into recipient gilts. *Veterinary Record*, v. 133, n. 2, 10 jul. 1993.
- Romar R et al.** Pig in vitro fertilization: Where are we and where do we go? *Theriogenology*, v. 137, p. 113–121, 1 out. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X19301840>>.
- Romar R, Funahashi H, Coy P.** In vitro fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years. *Theriogenology*, v. 85, n. 1, p. 125–134, 1 jan. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X15003751>>.
- Ruiz-Sánchez AL et al.** The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. *Theriogenology*, v. 66, n. 4, p. 736–748, 1 set. 2006.



**Soriano-Úbeda C et al.** Improving porcine in vitro fertilization output by simulating the oviductal environment. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, abr. 2017.

**Viana CHCV, Neto PNJ, Marques GM.** Inseminação artificial em suínos no Brasil: biotecnologias e atualidades do mercado. *Suinocultura Industrial*, v. 294, n. 03, p. 16-21, 2020.

**Wieczorek J et al.** Piglets born after intrauterine laparoscopic embryo transfer. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 18, n. 2, 1 jun. 2015.

**Wrathall A et al.** Successful intercontinental pig conceptus transfer. *Veterinary Record*, v. 87, n. 8, 22 ago. 1970.

**Yoshioka K et al.** Birth of Piglets Derived from Porcine Zygotes Cultured in a Chemically Defined Medium1. *Biology of Reproduction*, v. 66, n. 1, p. 112–119, 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod66.1.112>>.

**Yoshioka K et al.** Production of piglets from in vitro-produced blastocysts by ultrasound-guided ovum pick-up from live donors. *Theriogenology*, v. 141, p. 113–119, 1 jan. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X19304091>>.

**Zheng C et al.** Laparoscopic Embryo Transfer in Pigs: Knowledge for Surgical Procedures. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, v. 23, n. 2, jun. 2016.

---