



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS DE ARAGUAÍNA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**ISADORA AFONSO DE SOUZA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:  
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

ARAGUAÍNA/TO

2019

ISADORA AFONSO DE SOUZA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:  
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Monografia foi avaliada e apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Araguaína, Curso de Medicina Veterinária para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientadora: Francisca Elda Ferreira Dias

Coorientadora: Ana Kelen Felipe Lima

Araguaína/TO

2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

- S729r Souza, Isadora Afonso de.  
Relatório de estágio supervisionado: Produção In Vitro de embriões bovinos. / Isadora Afonso de Souza. – Araguaína, TO, 2019.  
52 f.
- Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Medicina Veterinária, 2019.  
Orientadora : Francisca Elda Ferreira Dias  
Coorientadora : Ana Kelen Felipe Lima
1. Reprodução Animal. 2. Bovinos. 3. Produção in vitro de Embriões. 4. Produção de embriões no estado do Pará. I. Título

**CDD 636.089**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**


ISADORA AFONSO DE SOUZA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:  
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

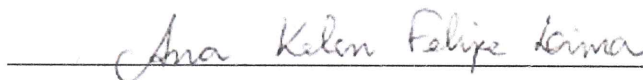
Monografia foi avaliada e apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Araguaína, Curso de Medicina Veterinária para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 19/06/2019

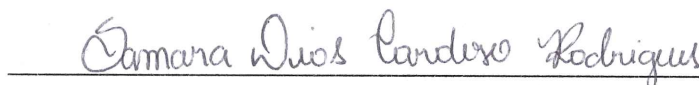
Banca Examinadora



Prof. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias, UFT



Prof. Dra. Ana Kelen Felipe Lima, UFT



M.V. Samara Dias Cardoso Rodrigues, UFT

Araguaína/TO

2019

Dedico este trabalho a minha família, em especial meus pais e minha irmã que foram o alicerce necessário nesta trajetória e também a aqueles que construíram esse sonho junto comigo e devido o destino divino ficaram pelo caminho, em especial meu tio Márcio (in memorian).

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente toda minha gratidão à Deus, minha fé foi o que me manteve de pé para encarar todos os obstáculos que foram postos.

Aos meus pais, Edmundo e Jucélia, meu eterno agradecimento, que mesmo eu distante tantas vezes não desistiram de ir até o fim junto comigo, me cuidando mesmo na ausência.

À minha irmã, Isabella, que mesmo tão distintas em personalidade, foi quem sempre me acolheu e entendeu, buscando o melhor para nós e nossos pais, e cuidando em especial da nossa mãe.

A todos os meus familiares, que sempre demonstraram apoio e orgulho do que resolvi buscar e me tornar. Principalmente aqueles de convivência diária na “Vila do chaves”.

Aos familiares que Deus levou para Sua graça durante essa trajetória, em especial meu Tio Márcio, sua partida marcou o início desse estágio e me fez enxergar tudo com outros olhos, meu eterno muito obrigada por tudo. Também Tio Edmar e Patrick, a perda de vocês durante esse trajeto me trouxeram inúmeras lições sendo a principal de não pensar duas vezes quando se trata de família, bons ou ruins são eles que nunca vão te abandonar.

À Turma Firme Na Traia, vocês foram família, mostraram como a união é possível sim dentro da Universidade, a perda da nossa amiga Mariana nos ensinou juntos como é importante ter amigos, e espero levar cada um além da UFT.

À família GERAN, colaboradores fiéis no meu crescimento acadêmico, meu muito obrigada por todos momentos vividos dentro do laboratório e toda ajuda com os projetos.

Aos meus amigos, que mesmo em dias de difícil convivência comigo se mantiveram firmes ao meu lado, sendo consolo e abrigo quando foi necessário, meu muito obrigada Juliana Canedo, Thainne, Ingrid, Jucilla, Juliana Anacleto, Kamilla, Haiane, Henrique, Carol Ongaratto, Carolina Dal Sant, Beatriz, Anna Karollyne, Khayla, Aurélio, Ana Paula, Clara, Guilherme e Huryel.

Aos professores, que foram verdadeiros mestres que compartilharam além dos seus ensinamentos, mas também suas experiências de vida, deixando em cada um de nós alunos não só a gratidão pelo aprendido a beleza da veterinária com vocês, mas também o exemplo de como ser seres humanos de excelência. Em especial minha orientadora Ana Kelen que se tornou uma mãezona dentro da universidade.

À Pecplan ABS (In Vitro Brasil) filial do Pará, que desde o princípio os coordenadores desta unidade, Faria e Nayara, não mediram esforços para abrir as portas para que eu obtivesse essa experiência, em especial, a equipe de laboratório Nayara, Thaisa, Pamela,

Patricia, Edilene e Juzieth, vocês foram essenciais nessa trajetória, os dias (principalmente as segundas-feiras) não seriam as mesmas sem vocês, mostrando como é importante manter um círculo de amizade tão bom dentro do trabalho, contribuindo tanto na meu aprendizado profissional quanto no pessoal.

## RESUMO

A produção *in vitro* de embriões vem se destacando no mercado da pecuária mundial por possibilitar a seleção e multiplicação de animais geneticamente superiores e aumentar o número de nascimentos por fêmea. O Brasil firmou-se como o país de maior aplicação de biotecnologias da reprodução em bovinos no mundo, sendo considerado o maior produtor mundial de embriões *in vitro* responsável por 85% da produção. Esse destaque é notado devido o país ser o principal exportador de carne bovina e possuir o maior rebanho comercial mundial, onde deste, a região Norte possui o segundo maior rebanho brasileiro. Atualmente muitas pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de maximizar a produção *in vitro* pela melhoria na taxa de produção e qualidade de embriões, para isso muitos protocolos com diferentes meios de cultivo e tempos são amplamente explorados. Ademais outros fatores são apontados como influenciadores nos resultados tais como: os efeitos ligados ao touro, os efeitos ligados a doadora e os efeitos do transporte destes oócitos. Devido a isto, este trabalho tem como objetivo fazer uma abordagem sobre a produção *in vitro* de embriões descrevendo seus aspectos, técnicas e os fatores que implicam na obtenção de bons resultados, além disso, expor o desenvolvimento da técnica no estado do Pará.

**Palavras-chaves:** Oócitos. Genética. Doadora.



## **ABSTRACT**

The in vitro production of embryos has been highlighting the world livestock market by enabling the selection and multiplication of genetically superior animals and increasing the number of births per female. Brazil has established itself as the country with the largest application of breeding biotechnologies in bovines in the world, being considered the largest in vitro embryo producer responsible for 85% of production. This highlight is due to the fact that the country is the main exporter of beef and has the largest commercial herd in the world, where the North has the second largest Brazilian herd. Currently many researches are being carried out with the aim of maximizing in vitro production by improving the production rate and quality of embryos, for which many protocols with different culture media and times are widely explored. In addition other factors are indicated as influencers in the results such as: the effects related to the bull, the effects related to the donor and the effects of the transport of these oocytes. Due to this, this work has as objective to make an approach on the in vitro production of embryos describing its aspects, techniques and the factors that imply in obtaining good results, in addition, to expose the development of the technique in the state of Pará.

**Key-words:** Oocytes. Genetic. Donor.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1: A:</b> Vista da entrada da empresa. <b>B:</b> Ante-sala onde é realizado trabalho administrativo e planejamentos mensais das atividades .....	12
<b>Figura 2: C:</b> Quadro de planejamento e logística mensal. <b>D:</b> Sala de reuniões.....	14
<b>Figura 3: E:</b> Laboratório. <b>F:</b> Sala de armazenamento de botijões e materiais de trabalho a campo.....	14
<b>Figura 4:</b> Classificação dos oócitos quanto ao COC e citoplasma .....	19
<b>Figura 5:</b> Técnico agropecuário realizando a classificação e seleção de oócitos .....	30
<b>Figura 6: A:</b> Preparação do sêmen. <b>B:</b> Preparação dos oócitos.....	32
<b>Figura 7:</b> Momento da fertilização <i>in vitro</i> onde os espermatozoides são colocados em contato com os oócitos na gota de meio FIV (ABS).....	32
<b>Figura 8: A e B:</b> Os embriões sendo envasados em palhetas de 0.25 ml com solução H-SOF (ABS)®.....	34
<b>Figura 9:</b> Embriões em transportadora WTA aptos a serem transferidos.....	34
<b>Figura 10: A:</b> Embriões sendo colocados na gota de de solução do poço 2 na placa de Petri. <b>B:</b> Embriões sendo colocados na ponta da OPS para serem vitrificados.....	36
<b>Figura 11:</b> OPS contendo os embriões sendo colocada diretamente no Nitrogênio Líquido (N <sub>2</sub> ).....	37
<b>Figura 12: A:</b> Preparação das gotas em Placa de Petri para realização do protocolo de <i>Direct Transfer</i> . <b>B:</b> Palhetas envasadas com os embriões dentro da máquina de congelar embriões (TK-3000 SE compacta).....	37
<b>Figura 13:</b> OPS contendo os embriões selecionados iniciando o processo de descongelamento sendo mergulhada na solução do poço 1.....	38
<b>Figura 14: A e B:</b> Blastocistos.....	39
<b>Figura 15: A:</b> Bancada com materiais onde os embriões são montados. <b>B:</b> Embriões sendo montados na bainha e acoplados ao inovulador.....	41
<b>Gráfico 1 –</b> Descrição das atividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular Supervisionado entre 11/03 a 24/05 de 2019.....	15

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OPU	<i>Ovum Pick Up</i>
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de embriões
ABCZ	Associação Brasileira Dos Criadores De Zebu
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
TE	Transferência de embriões
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
FIV	Fertilização <i>In Vitro</i>
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i>
COC	Complexo <i>Cumulus Oophorus</i>
TCM 199	Meio de Cultivo Tecidual 199 ( <i>Tissue Culture Medium</i> )
FSH	Hormonio foliculo estimulante
LH	Hormonio Luteinizante
EGF	Fator de crescimento epidermal
CSF	Fator citostático
PHE	Epinefrina
SOF	Fluido sintético do oviduto ( <i>Synthetic Oviductal Fluid</i> )
CL	Corpo luteo
ECC	Escore de condição corporal
OPS	Palheta de 0,25 ml com diametro interno reduzido
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 alpha
ECG	Gonadotrofina corionica equina
DG	Diagnóstico de gestação

## LISTA DE SÍMBOLOS

ml	mililitro
°C	Graus Celsius
$\alpha$	Alpha

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
2	<b>CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....</b>	<b>13</b>
3	<b>ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....</b>	<b>15</b>
4	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
4.1	<b>Produção <i>in vitro</i> de embriões.....</b>	<b>17</b>
4.2	<b>Aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU).....</b>	<b>17</b>
4.2.1	Seleção de oócitos.....	18
4.3	<b>Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....</b>	<b>19</b>
4.4	<b>Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....</b>	<b>20</b>
4.5	<b>Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....</b>	<b>22</b>
4.6	<b>Fatores que influenciam na PIVE.....</b>	<b>23</b>
4.6.1	Fatores relacionados à doadora.....	23
4.6.2	Fatores relacionados ao touro reprodutor.....	26
4.6.3	Fatores relacionados aos efeitos do transporte.....	27
4.7	<b>Perspectivas futuras para a PIVE.....</b>	<b>28</b>
5	<b>PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS NO ESTADO DO PARÁ.....</b>	<b>29</b>
5.1	<b>Aspiração guiada por ultrassonografia (OPU) e seleção de oócitos.....</b>	<b>29</b>
5.2	<b>Maturação <i>In Vitro</i>.....</b>	<b>30</b>
5.3	<b>Fertilização <i>In Vitro</i> e Preparo do Sêmen.....</b>	<b>30</b>
5.4	<b>Cultivo <i>In Vitro</i>.....</b>	<b>33</b>
5.5	<b><i>Feeding</i>.....</b>	<b>33</b>
5.6	<b>Previsão para envase.....</b>	<b>33</b>
5.7	<b>Envase.....</b>	<b>33</b>
5.8	<b>Vitrificação e <i>Direct Transfer</i>.....</b>	<b>35</b>
5.9	<b>Desvitrificação.....</b>	<b>37</b>
6	<b>TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES E DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO....</b>	<b>40</b>
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>42</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização das biotecnologias aplicadas à reprodução animal vem sendo considerada a base da produção da pecuária mundial, tornando-se cada vez mais importante para atender as exigências que surgem no mercado, colaborando para enfrentar parte dos desafios que ainda surgirão nas próximas décadas.

A produção *in vitro* de embriões vem crescendo em larga escala como alternativa que possibilita a seleção e multiplicação de animais geneticamente superiores e o aumento do número de nascimentos por fêmea. O desenvolvimento da aspiração folicular *in vivo* ou OPU (*ovum pick up*) e o aperfeiçoamento das condições de cultivo *in vivo* viabilizaram a comercialização da técnica na qual já é possível encontrar incorporada dentro de programas de melhoramento genético.

O presente trabalho teve por objetivo apresentar as atividades desenvolvidas durante o período de Estágio Curricular Supervisionado Obrigatório do Curso de Medicina Veterinária da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins.

O estágio curricular foi realizado no período de 11 de março de 2019 à 24 de maio de 2019, acompanhando a rotina laboratorial da empresa Pecplan ABS, localizado na cidade de Xinguara estado do Pará, sob a supervisão do Médico Veterinário Emerson Faria, com duração de 400 horas.

A escolha do local de estágio se deu por esta ser a empresa pioneira na produção *in vitro* de embriões, In vitro Brasil (Pecplan ABS), a qual se tornou referência tanto por seus índices desenvolvidos nacionalmente como pelas pesquisas desenvolvidas internacionalmente.

Ademais, o objetivo de aplicar os conhecimentos adquiridos ao longo do curso norteou a escolha do local citado, bem como a expectativa do acompanhamento da rotina de reprodução e biotecnologia animal laboratorial.

Este relatório é composto por informações detalhadas referentes ao local do estágio, atividades desenvolvidas, e descrição das etapas, aspectos e técnicas empregadas na *fertilização in vitro* de embriões bovinos.

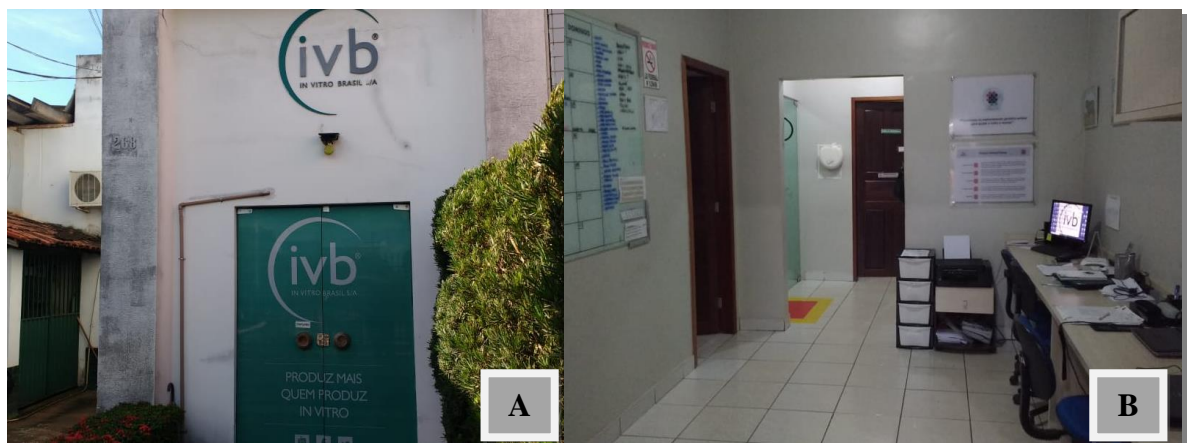
## 2 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

A empresa Pecplan ABS localiza-se na Avenida Xingú, nº268, centro, Xinguara-PA e realiza serviços como seleção de receptoras e sincronização hormonal, seleção de doadoras e aspiração folicular, produção *in vitro* de embriões, vitrificação e congelamento de embriões, transferência de embriões e diagnóstico de gestação. A mesma concentra suas atividades nos estados do Pará, Matogrosso, Tocantins e Maranhão.

A empresa possui uma sala de recepção, uma ante-sala com bancada para trabalho administrativo (Figura 1) e quadro de organização de trabalhos mensais (Figura 2), uma sala de reuniões (Figura 2), 2 banheiros, laboratório de produção *in vitro* de embriões (Figura 3), sala de armazenamento de botijões (Figura 3) e materiais de trabalho a campo, estoque, sala de esterilização e copa. Tanto a equipe na rotina laboratorial quanto a de rotina à campo contam com a utilização de materiais de alta tecnologia e que colaboram para a melhoria e obtenção de bons resultados.

A equipe é composta por seis médicos veterinários, três biomédicos, dois técnicos agropecuários e um auxiliar de laboratório.

**Figura 1:** **A:** Vista da entrada da empresa. **B:** Ante-sala onde é realizado trabalho administrativo e planejamentos mensais das atividades



Fonte: AUTOR, 2019

**Figura 2: C: Quadro de planejamento e logística mensal. C: Sala de reuniões.**



Fonte: AUTOR, 2019

**Figura 3: E: Laboratório. F: Sala de armazenamento de botijões e materiais de trabalho a campo.**



Fonte: AUTOR, 2019

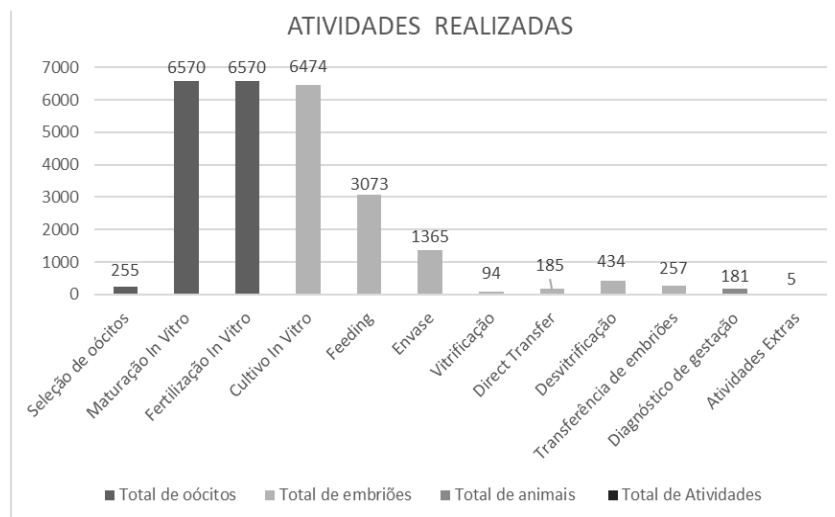


### 3 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Dentro da rotina do laboratório foi possível acompanhar todos procedimentos envolvidos na PIVE, dos quais, seguiam a ordem cronológica de dia e horários dos eventos biológicos envolvidos dentro da técnica. Além disso, devido ao atendimento da empresa a outros estados conforme a logística de distância e tempo, foi possível acompanhar procedimentos os quais o laboratório se deslocou para realização de algumas etapas do processo, como desvitrificação e envase, nos estados do Tocantins e Maranhão.

As atividades acompanhadas (apontadas no Gráfico 1) foram concentradas nas etapas de fertilização *in vitro*, cultivo *in vitro*, 1 e 2 *feeding*, previsões para envase e o envase de embriões. Além disso, também foram acompanhadas desvitrificações de embriões e transferência de embriões.

**Gráfico 1** – Descrição das atividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular Supervisionado entre 11/03 a 24/05 de 2019



Fonte: AUTOR, 2019

O acompanhamento das atividades durante o estágio possibilitou ampliar o conhecimento prévio adquirido durante o percurso acadêmico, o qual permitiu visualizar amplamente e praticamente a importância da biotecnologia aplicada à reprodução animal no cenário atual do sistema de produção bovino. A empresa atua tanto no ramo do gado leiteiro,

visando obter melhoramento e seleção genética com baixo custo e tempo, quanto no ramo do gado de corte, o qual visa obter maior número de prenhez com baixo custo contendo o aporte genético para produção de animais qualificados para o abate.

Nesse sentido, devido à grande quantidade de procedimentos realizados dentro da rotina do laboratório, bem como o avanço e destaque que essa biotécnica vem ganhando dentro do mercado do melhoramento genético, optou-se pela realização desse estudo o qual descreve as etapas envolvidas dentro da produção *in vitro* de embriões bovinos e os apontamentos de pontos negativos que podem ser melhorados dentro dessa técnica, além de perspectivas atuais do mercado para obtenção de melhores resultados afim de abranger um maior número de produtores interessados em adotar essa tecnologia.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Produção *In Vitro* de Embriões

O Brasil passou a dominar a Produção *in vitro* de embriões (PIVE), ocupando uma posição importante no mercado de embriões bovinos, principalmente, por possuir o maior rebanho comercial do mundo e ser o principal exportador de carne bovina (SENEDA, 2002), onde em 2005, firmou-se como o país de maior aplicação de biotecnologias da reprodução em bovinos no mundo (VIANA e CAMARGO, 2007). Atualmente, segundo dados da ABCZ, o Brasil é considerado o maior produtor de embriões de fertilização *in vitro* no mundo, com produção que corresponde a 85% do mercado mundial considerando todas as raças.

A produção *in vitro* de embriões, juntamente as demais biotecnologias aplicadas a reprodução, tais como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a transferência de embriões (TE), vêm sendo desenvolvidas a fim de maximizar o potencial genético reprodutivo de fêmeas bovinas e melhorar os indicadores de produtividade. Esta técnica especificamente tem sido utilizada em larga escala comercialmente e por diversos laboratórios no país para pesquisa e multiplicação de material genético na produção animal (ALVES et al., 2003; RUMPF, 2007; BUENO e BELTRAN, 2008; SANTOS, 2010; ANDRADE et al., 2012).

A PIVE consiste na obtenção de embriões viáveis a partir de fêmeas saudáveis de alto valor genético e também de fêmeas que não estão mais aptas a produzirem descendentes pelas técnicas convencionais. Esta tornou-se uma importante e destacada biotécnica reprodutiva por conseguir realizar a interação entre o espermatozoide e o oócito fora do trato reprodutivo da fêmea, permitindo a formação de um novo indivíduo.

O processo envolve as etapas de coleta dos oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo ou co-cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e embriões fora do útero animal (GONÇALVES et al., 2008).

### 4.2 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU)

A versatilidade da aplicação da OPU na coleta de oócitos otimizou a propagação na utilização da técnica PIVE, onde tem sido utilizada como instrumento importante para exploração maximizada do potencial reprodutivo dos rebanhos bovinos, pois viabiliza a utilização de animais bastante jovens, diminuindo o intervalo entre gerações e permitindo selecionar matrizes potenciais, levando à produção de novilhas de reposição apenas de

animais geneticamente superiores, o que contribui para a otimização do melhoramento genético (VARAGO et al. 2008).

Devido a este fato, a OPU tornou-se a melhor opção na recuperação de oócitos *in vivo* da espécie bovina (BOLS et al., 2004; GONÇALVES et al., 2007; ANDRADE et al., 2012), o que favoreceu uma maior rapidez de operação, se tornando importante em laboratórios de PIVE (GORDON et al., 2003), trazendo ainda a vantagem de não depender de pré-estimulação hormonal para realização da técnica. É importante ressaltar que deve-se considerar a qualidade dos oócitos recuperados, os quais em literatura é abordado que apresentam inferioridade de qualidade devido a rapidez do procedimento.

Dependendo da metodologia adotada para a recuperação dos oócitos é possível observar consequências na morfologia dos COC's, o que pode influenciar posteriormente na taxa de desenvolvimento *in vitro*. A importância das células do *cumulus* estarem intactas para a etapa de maturação oocitária e o desenvolvimento *in vitro* não devem ser desprezadas (SIRARD et al., 2017).

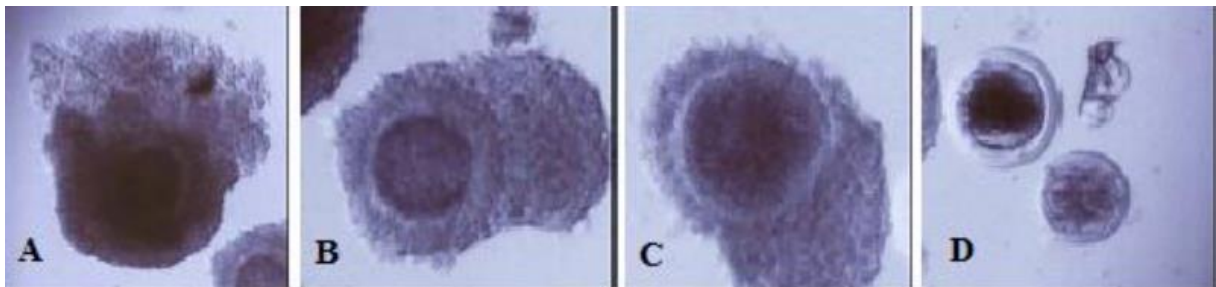
O primeiro pré-requisito para o sucesso da técnica é a obtenção de oócitos de boa qualidade, com boas características morfológicas e de desenvolvimento. Tais características dependem do tamanho do folículo de origem e a extensão e integridade de células do *cumulus* os quais influenciam na capacitação oocitária (SIRARD et al., 2017).

#### 4.2.1 Seleção de oócitos

Estima-se o potencial do ócito para maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário através da avaliação das células do cumulus, as quais são qualificadas morfológicamente a fim de selecionar aqueles de maior viabilidade. Segundo Gonçalves et al., (2008), os oócitos são classificados em graus de I a IV, onde é levado em consideração a quantidade de camadas de células do *cumulus* e o aspecto do citoplasma, conforme descrito abaixo:

GRAU I	GRAU II	GRAU III	GRAU IV
Mais de três camadas de células do cumulus, com citoplasma homogêneo	Células do cumulus em menos de três camadas. O citoplasma possui granulações distribuídas de maneira heterogênea.	Células do cumulus expandidas. Citoplasma irregular ou vacuolizado.	Ausência de células do cumulus, oócito apresentando-se desnudo

**Figura 4** : Classificação dos oócitos **A**: Grau I **B**: Grau II **C**: Grau III **D**: Grau IV



Fonte: PENITENTE FILHO, 2011.

### 4.3 Maturação *in vitro* (MIV)

Os oócitos assim que retirados dos folículos ovarianos (normalmente entre 2-6 mm de diâmetro) ainda não se apresentam aptos para sofrerem fecundação normal e desenvolvimento embrionário inicial, sendo necessário passarem por uma série de modificações estruturais e bioquímicas no núcleo (maturação nuclear) e no citoplasma (maturação citoplasmática) para adquirirem capacidades de ser fecundado, que em seu conjunto são denominadas de maturação oocitária (GONÇALVES et al., 2002).

Essa etapa é realizada através do cultivo dos oócitos, logo após a aspiração do folículo, em meio de maturação com temperatura e atmosfera apropriadas (DODE & RUMPF, 2002). Em bovinos, o período de maturação varia de 18 a 24 horas em atmosfera controlada, contendo 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada (PENITENTE FILHO, 2011), e os meios de cultivo mais utilizados nessa etapa, em rotina nos laboratórios, são o TCM 199, acrescido de 10% de soro bovino, FSH, LH, estradiol e EGF (GALLI & LAZZARI, 2000).

A maturação envolve mudanças nucleares e citoplasmáticas que devem ocorrer simultaneamente em oócitos e espermatozoides permitindo que estes descondensem a cabeça do espermatozoide, formem os pró-núcleos e possuam um desenvolvimento embrionário normal (DODE et al., 2000). As etapas de evolução do oócitos compreendem o avanço para metáfase, seguindo para anáfase I (AI) e telófase I (TI), onde depois de maturados, permanecem em metáfase II até a fecundação, devido ao fator citostático (CSF) (BETAGNOLLI et al., 2004). Este fator é responsável pelo boqueio na metáfase II através do controle de várias vias, como: a via das MAP cinases (MAPK), a qual está envolvida, principalmente, na manutenção da suspensão do oócito em metáfase II e a via do inibidor mitótico 2 (Emi2), que realiza um duplo trabalho, tanto em originar a interrupção da meiose como em manter o oócito em metáfase II. Estas vias precisam ser aumentadas para que ocorra

o bloqueio da retomada da meiose. Com isso, sugere-se que maturação citoplasmática consiste em diversas modificações ultraestruturas, moleculares e bioquímicas do citoplasma e da membrana plasmática do oócito, que o permitem adquirir a competência para o desenvolvimento e o mecanismo enzimático relacionado ao bloqueio da polispermia. Observa-se que a maioria dos oócitos coletados para PIVE está incluso em pequenos folículos antrais e, desse modo, a capacitação é adquirida ao longo do desenvolvimento folicular devido as transformações ocorridas no oócito durante esse período, que o tornam apto a suportar as fases iniciais do desenvolvimento embrionário (RIZOS et al., 2002; HUMBLOT et al., 2005).

As primeiras alterações possíveis de serem analisadas através da microscopia são a dissolução da membrana nuclear, expulsão do primeiro corpúsculo polar e a criação do segundo fuso meiótico depois de ocorrer o amadurecimento do oócito e expansão das células do *cumulus* (GORDON, 2003).

A expansão das células do *cumulus* na superfície do oócito indica que este foi maturado e coincide com a retomada da meiose (BARRETTO, 2007), onde normalmente após esse evento, a mesma é removida por uma pipeta para a realização da fertilização (MENCHACA et al., 2016; AMINI et al., 2016; ROOVER et al., 2007).

#### **4.4 Fertilização *in vitro* (FIV)**

Palma (2008) descreve a FIV como sendo a etapa em que os oócitos maduros são cultivados juntamente com os espermatozoides, possibilitando a fecundação, gerando posteriormente o zigoto, que evolui até o estágio de blastocisto (MELO et al., 2016).

Sabe-se que, no processo *in vivo*, os espermatozoides precisam chegar até a ampola da tuba uterina para fecundar o oócito, e que durante esse percurso substâncias presentes no sistema reprodutor da fêmea induzem a capacitação dos espermatozoides, onde se observaram modificações bioquímicas, tais como alteração na fluidez e no teor lipídico da membrana plasmática, resultando em uma hiperativação espermática. Desse modo, esse processo torna possível a ligação da membrana do espermatozoide a receptores específicos na zona pelúcida do oócito (ZP3), onde este é responsável por induzir a reação acrossômica. Além disso, outra interação mais íntima ocorre entre o receptor ZP2 e um receptor de membrana acrossômico interno (HAFEZ & HAFEZ, 2004)

Já no processo *in vitro*, os meios e os protocolos usados devem fornecer um ambiente adequado, sendo que esse deve permitir o metabolismo dos oócitos e células do *cumulus*,

além de manter a função espermática eficiente para que ocorra a fecundação (YANG et al., 1993; ASSUMPÇÃO et al., 2002; GONÇALVES et al., 2007).

Para que se obtenha êxito nesta etapa, é necessário que ocorra a preparação adequada dos dois gametas, assim como meios de cultivo e condições favoráveis para que ocorra a fertilização (GORDON, 2003). Segundo Correa (2006), a FIV possui duração de 18 a 22 horas, em temperatura de 38,5°C, atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade a 95%. Além disso, o meio mais utilizado pelos laboratórios é o FERT-TALP adicionado de penicilina, hipotaurina e epinefrina (PHE), e heparina, com a finalidade de aumentar a atividade espermática e facilitar a sua penetração, melhorando os índices de fecundação (MACHADO, 2009).

Vários laboratórios utilizam sêmen congelado. Porém, após descongelar é preciso selecionar os espermatozoides vivos e aptos a fecundar (VARAGO et al., 2008). Para isto, são empregados vários recursos de eliminação do plasma seminal e separação da fração móvel do sêmen diluído e descongelado, sendo as mais comuns para a preparação de espermatozoides o gradiente de Percoll® ou *Swim-up* (WRENZYCKI, 2016; FONSECA, 2010). O procedimento ideal para separação espermática deve ser rápido, simples, de baixo custo, capaz de recuperar maior parte dos espermatozoides móveis, não promover alterações espermáticas, remover substâncias tóxicas e bioativas, espermatozoides mortos e outras células, incluindo microorganismos, permitindo processar grandes volumes de sêmen, além de possibilitar o controle da concentração e volume final da suspensão espermática (MARTINEZ, 2007).

Para a realização da FIV propriamente dita, os espermatozoides vivos são adicionados nas gotas de fecundação contendo os oócitos em uma concentração final que pode variar de 1,0 a 5,0 x 10<sup>6</sup> espermatozoides viáveis/mL de meio (IRITANI e NIWA, 1977; DAYAN, 2001).

Para que a FIV ocorra com sucesso, é necessário que os oócitos tenham sofrido a maturação completa, que os espermatozoides tenham sido apropriadamente preparados e que os mesmos se encontrem em um ambiente adequado (MOTA et al., 2012).

#### **4.5 Cultivo *in vitro* (CIV)**

O cultivo corresponde à etapa de desenvolvimento do oócito fertilizado até o estágio de blastocisto (SANGILD et al., 2000).

O sistema de cultivo empregado nessa etapa deve proporcionar condições adequadas para as primeiras clivagens, ativação do genoma embrionário e conseqüentemente

desenvolvimento até o estágio de blastocisto nos programas comerciais ou de pesquisa, visando a transferência para as receptoras.

As condições de cultivo *in vitro* são consideradas muito importantes para que bons índices de produção de embriões sejam alcançados, razão pela qual inúmeras pesquisas tem sido realizadas, visando avaliar o efeito que diferentes fatores, intrínsecos e extrínsecos, possam exercer sobre o metabolismo e capacidade de desenvolvimento destes embriões, como por exemplo a composição dos meios de cultivo e condições de temperatura e atmosfera gasosa, a adição de aminoácidos, vitaminas, macromoléculas e fatores de crescimento, assim como o uso de soro (NAGAI, 2001).

Atualmente, diversos sistemas de cultivo *in vitro* vêm sendo empregados com sucesso, todos eles tentando mimetizar ao máximo as condições uterinas. No entanto, a tuba uterina e o útero apresentam várias alterações no decorrer do desenvolvimento embrionário, o que os torna um sistema muito complexo e de difícil reprodução *in vitro* (DODE et al., 1999). A principal diferença descrita em literatura é a quantidade de oxigênio, onde, no ambiente *in vivo* é inferior à quantidade utilizada nos sistemas de cultivo *in vitro*, assim havendo importante interferência na realização e na qualidade dos embriões (CHAVES et al., 2010).

Dentro dos meios de cultivo comumente citados para utilização nessa etapa, o TCM 199 é um meio complexo desenvolvido para a preservação celular em geral, enquanto que o *Synthetic Oviductal Fluid* (SOF) é classificado como um meio simples, desenvolvido e direcionado para a criação de embriões (GONÇALVES et al., 2002). Pesquisas feitas com a utilização dos dois meios para CIV embrionário em bovinos, obtiveram resultados que indicam que não há diferenças nas taxas de clivagem, mórulas e blastocistos, entretanto sugerem que o uso do SOF proporciona um ambiente mais adequado, pois existem diferenças no padrão de expressão de genes ligados à pré-implantação de embriões (WRENZYCKI et al., 2001).

O tempo de cultivo *in vitro* varia de 7 a 9 dias, dependendo do objetivo da rotina de PIV, em temperatura de 39 °C com atmosfera controlada (5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>) e umidade saturada. A taxa de blastocisto comumente é avaliada no 7º dia de cultivo *in vitro* sendo que, os blastocistos produzidos podem permanecer na estufa de cultivo até o 9º dia, caso se deseje avaliar a taxa de eclosão *in vitro* (PENITENTE FILHO, 2011).



## 4.6 Fatores que influenciam na PIVE

Apesar do ascendente desenvolvimento da PIVE no Brasil, ainda há aspectos a serem melhorados para maior eficácia desta técnica, pois, mesmo com tais avanços, ainda possui algumas limitações devido a fatores que podem afetar tanto a qualidade do embrião produzido, como também a taxa de prenhez de receptoras. Scanavez et al. (2013) relataram que a taxa de gestação e a perda gestacional podem sofrer efeito do grupo genético da receptora, o lado de implantação do corpo lúteo (CL), da qualidade do touro, do estágio de desenvolvimento e do tempo de cultivo do embrião, da sequência de horas de serviço gastas para realizar as transferências, do número de transferências realizadas anteriormente em cada receptora, e do tempo de transporte do oócito e dos meios de cultivos utilizados.

Mello et al. (2016) apontam que os fatores ligados a doadora também podem influenciar positiva ou negativamente nos resultados da técnica, como o grupo genético, a categoria animal, o número de partos, a idade, a fase do ciclo estral, o estado nutricional, a sanidade e a sazonalidade.

### 4.6.1 Fatores relacionados à doadora

Dentre os fatores mencionados ao efeito da doadora sob o sucesso da técnica, destacam-se os efeitos raça, nutrição, estado reprodutivo e idade e a estimulação hormonal realizada bem como a frequência de aspirações realizadas.

Animais de raças taurinas tendem a ser mais produtivos que os de raças zebuínas, tanto na produção de leite quanto na de carne, devido a histórica seleção genética. Todavia, os animais de origem zebuína têm despertado interesse dos produtores, devido sua adaptabilidade às condições oferecidas, tanto para produzir leite quanto carne, que na grande maioria, são condições desfavoráveis, baseadas em climas quentes, pastagens pobres e presença de parasitas (PONTES et al., 2011). Contudo, animais de origem taurina e zebuína sob as mesmas condições ambientais e de nutrição, demonstram representativa diferença nas concentrações hormonais e função ovariana (SARTORI et al., 2016).

Andrade et al. (2012), analisando os fatores que afetam a taxa de gestação de embriões oriundos de doadoras da raça Nelore e Senepol, denotam que tanto o genótipo do embrião, quanto a sua qualidade, não influenciou o número de gestações.

Sales et al. (2015) apontam também que vacas *Bos indicus* apresentam maior produção total de oócitos, oócitos viáveis e melhor índice de qualidade dos oócitos, quando comparadas

a vacas *Bos taurus*, o que pode explicar a maior taxa de clivagem dos gametas observada nesses animais.

O fator nutricional está intimamente ligado a capacidade e desempenho reprodutivo dos bovinos, podendo afetar diretamente o metabolismo e fisiologia dos animais. Torres et al. (2015) e Ferreira et al. (2013) afirmam que vacas que apresentam escore corporal (ECC) mais alto apresentam um melhor desempenho reprodutivo. Em controvérsia, Stadink et al. (2017) apontam que vacas de maior escore apresentam com maior frequência casuísticas de cistos ovarianos, logo, o excesso de peso reflete negativamente sobre a qualidade do desempenho reprodutivo dos animais. Já Kouamo et al. (2014) afirmam que para programas de PIVE, vacas com ECC médio (escore 3) apresentam maior produção média de oócitos viáveis que animais mais obesos (escore 4-5) e que animais de estado nutricional baixo (escore 1-2).

Outro fator de relevância é a fase do ciclo estral que a fêmea destinada a aspiração se encontra e com que idade é inserida dentro do programa de PIVE. Segundo Reis et al. (2006), é desejável que animais destinados a OPU se encontrem na fase luteínica do ciclo, na qual é possível encontrar folículos de diversos tamanhos e em diferentes fases de crescimento, pois animais em fase folicular, na qual os ovários se encontram na presença de um folículo dominante, este tende a levar à atresia dos demais folículos em crescimento. No entanto, encontram-se controvérsias na literatura, as quais apontam que a presença do corpo lúteo não influencia a qualidade de oócitos imaturos, do ponto de vista nuclear e morfológico (BATISTA et al., 2016). A qualidade dos oócitos recuperados também levanta questionamentos perante a idade que a fêmea começou a passar pelo procedimento de OPU, em que animais pré-púberes apresentam uma qualidade inferior de COC's recuperados, comparado a animais adultos.

A inserção de animais pré-púberes nos programas de PIVE representa um grande avanço, pois, permite a redução significativa do intervalo entre gerações, permitindo acelerar o melhoramento genético (LANDRY et al., 2018). Contudo, a literatura aponta que fêmeas mais jovens possuem pior desempenho, principalmente na taxa de clivagem e de formação de blastocistos, embora possuam maior número de oócitos recuperados, em comparação a fêmeas púberes (LANDRY et al., 2016). Com o avanço da idade em fêmeas pré-púberes, observa-se diminuição do número de oócitos recuperados na OPU, porém observa-se maior qualidade oocitária, resultando em melhores taxas de clivagem e blastocistos, denotando que fêmeas muito jovens não são capazes de sustentar folículos maiores devido a menor capacidade de liberação de LH (CURRIN et al., 2017; LANDRY et al., 2016).

Devido ao alto valor zootécnico das doadoras, é comum os animais permanecerem dentro dos programas de PIVE até atingir a senilidade, onde é importante ressaltar que, com a idade mais avançada esses animais apresentaram alterações qualitativas e quantitativas nas estruturas recuperadas, das quais irão apresentar resultados abaixo que os das fêmeas jovens e de meia idade, onde, além de produzirem menor número de oócitos na OPU, também resultam em menor taxa de blastocistos, devendo-se então, avaliar a viabilidade de se manter vacas por muito tempo no rebanho (SU et al., 2012).

Para a PIVE, é relevante que os oócitos sejam advindos de folículos maiores, pois estes apresentam maior capacidade de se desenvolver e formar um embrião, e tornar-se capaz de clivar e ser cultivado, formando um embrião apto a ser transferido, resultando em gestação. No entanto, há a possibilidade de se sincronizar a onda de crescimento folicular para realizar a coleta dos oócitos em um melhor momento, através da utilização de hormônios gonadotróficos (SILVA et al., 2017) ou esteróides, para indução de uma nova onda folicular (CAVALIERI et al., 2018). Pode-se então, optar para zerar a onda de crescimento folicular, através da administração de progestágeno e estradiol (dia zero), podendo ser feito em dia aleatório do ciclo estral (CAVALIERI et al., 2018; SILVA et al., 2017; VIEIRA et al., 2016; VIEIRA et al., 2014). Silva et al. (2017) relataram que a estimulação pelo FSH foi eficiente em promover o crescimento de folículos antrais, porém não teve efeito positivo na quantidade e qualidade de oócitos. No entanto, Vieira et al. (2014; 2016), defendem que os protocolos culminam em efeitos positivos na PIVE.

Por fim, o intervalo entre as sessões de OPU, juntamente com o número de sessões realizadas por doadora, também são fatores de grande relevância, pois a perfuração dos ovários gera várias lesões, que pode culminar com a diminuição do número de folículos e de oócitos, como descrito por Gimenes et al. (2015) ao efetuarem seis sessões de OPU com intervalo de 14 dias. Monteiro et al. (2017) relataram que fêmeas com alta produtividade de oócitos apresentariam, maior risco de danos aos ovários devido ao maior número de perfurações que sofrem, porém acrescentou que a medida que ocorreu diminuição do número de oócitos, observou-se aumento na quantidade de blastocistos por OPU.

#### 4.6.2 Fatores relacionados ao touro reprodutor

Dando ênfase ao espermatozoide como o veículo de entrega do complemento genético paterno para o oócito crucial para a embriogênese (BARROSO et al., 2009), a literatura aponta que sua participação no processo de produção *in vitro* de embriões é muito além que

só a colaboração com seu DNA (CUMMINS, 2001). Barroso et al. (2009) relataram que o espermatozoide apto a fecundação é essencial para contribuição de pelo menos três elementos: o genoma haplóide paterno, a sinalização para iniciar a ativação metabólica do oócito (incluindo a tradução do RNA), e o centríolo, capaz de direcionar a montagem dos microtúbulos, conduzindo a formação do fuso mitótico durante a evolução inicial do zigoto.

Um dos principais aspectos a se atentar durante a PIVE, em relação aos espermatozoides, é a capacitação, pois em condições fisiológicas. Estes sofrem obrigatoriamente esse processo durante a passagem pelo trato genital da fêmea, para se tornarem capazes de fecundar o oócito (GORDON, 2003), e durante o processo *in vitro*, torna-se necessário optar pelo uso de substâncias capazes de capacita-lo, como a heparina (VARAGO et al., 2017).

As alterações embrionárias ocasionadas pelo touro são analisadas de forma inicial e tardio, onde o efeito paterno inicial é observado através do diagnóstico baseado na baixa qualidade morfológica de um zigoto ou do embrião, bem como na baixa velocidade de clivagem, não sendo considerada à fragmentação do DNA (SANTOS, 2014). Já os efeitos paternos tardios, são descritos por Tesarik (2005) através da manifestação de baixa competência de desenvolvimento, o que desencadeia falhas na implantação, fator esse associado ao aumento da incidência de fragmentação de DNA na ausência de alterações morfológicas em zigotos e embriões nos primeiros estádios de clivagem.

O uso de sêmen criopreservado é indispensável para a PIVE, e para que haja o congelamento dessas doses é indispensável que ocorra diluição prévia e adequada. Prado et al. (2005) afirmam que a finalidade dos diluidores é proteger os espermatozoides, e oferecer condições mínimas de sobrevivência e capacitação para que ocorra a fertilização. Com isso, faz-se necessário avaliar e testar a proteção e a viabilidade oferecida aos espermatozoides bovinos nos diferentes meios propostos, como os compostos por proteína vegetal ou por proteína animal, visando estabelecer o melhor no desempenho frente à fertilização *in vitro* (AMARAL et al., 2016).

Dentro da utilização indispensável do sêmen criopreservado, ainda existem comparações na utilização das doses de sêmen convencionais e as doses sexadas. Araújo et al. (2014) relataram que a fertilização *in vitro* torna-se a alternativa mais racional para a utilização comercial do sêmen sexado, levando em conta o reduzido número de espermatozoides disponíveis nas doses sexadas. Contudo, embora a técnica de sexagem espermática por citometria de fluxo tenha garantido maior eficiência quanto a produção de bovinos, estudos com sêmen sexado tem demonstrado que a taxa de concepção com esse tipo

de material pode ser inferior comparando-a ao sêmen convencional (De VRIES et al., 2008). Devido a esse fator, Serafim et al. (2018) destacaram que os reprodutores devem ser selecionados avaliando não apenas pelo potencial de produção de espermatozoides, mas também pela susceptibilidade de suas células espermáticas resistirem à citometria de fluxo, tendo em vista que a taxa de formação de blastocistos e fertilidade dos embriões produzidos *in vitro* sofrem influência individual de touros, cujo material genético é designado para sexagem.

#### 4.6.3 Fatores relacionados aos efeitos do transporte

Com o crescimento e disseminação da técnica de produção *in vitro* de embriões, alguns produtores que buscam adotar a técnica podem estar localizados distantes de um laboratório. Com isso, a distância entre as fazendas e o laboratório tornou-se temporariamente uma problemática para a realização dos procedimentos. Entretanto, sabe-se que a distância não impede que as empresas se desloquem até esses produtores para prestarem seus serviços (LOIOLA et al., 2014). Cavalieri et al. (2015) afirmam que o tempo consumido no transporte dos oócitos, da fazenda para o laboratório e dos embriões para a fazenda, pode trazer prejuízos a viabilidade, implicando na necessidade de possuir técnica especializada para transportar os embriões, bem como meios de cultivo adequados e atmosfera controlada com 5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>. Tanto Cavalieri et al. (2015), simulando o transporte de embriões por até 48 horas, quanto Loiola et al. (2014), analisando o transporte por 2000 km entre a fazenda e o laboratório, evidenciaram que não houve efeitos negativos do transporte por longo trajetos ou por várias horas, validando assim os programas de PIVE mesmo para produtores que se encontram distantes dos laboratórios, sendo importante salientar que para o sucesso empregado na PIVE, vários processos e fatores laboratoriais são levados em conta, tais como temperatura, atmosfera e meios de cultivo (BERNAL et al., 2011).

#### 4.7 Perspectivas futuras para a PIVE

Embora no Brasil tenha atingido escala comercial, ainda existem algumas limitações para a PIVE, já discutidas anteriormente, que implicam no aumento do custo de cada embrião.

Desta forma, o desenvolvimento de novas estratégias para sobrepor estas limitações tem merecido atenção por parte dos pesquisadores. A adição de antioxidantes (L-ergotioneína ou dimetilglicina) aos meios de cultura promoveu a melhora da qualidade dos embriões bovinos (TAKAHASHI et al., 2016; ZULLO et al., 2016) assim como maior resistência à criopreservação (ZULLO et al., 2016).

Outra novidade promissora é a avaliação da quantidade de hormônio anti-mulleriano (AMH) em bovinos, que está conectada com a quantidade e qualidade dos COC's recuperados, sendo capaz de ser utilizado para selecionar animais com maior potencial para uso na PIVE, aumentando o processo de ganho genético, tornando-se um marcador endócrino de reserva ovariana, em virtude de possibilitar a avaliação de animais jovens antes do amadurecimento sexual (GUERREIRO et al., 2014; VERNUNFT et al., 2015; BARUSELLI et al., 2015). Silva et al. (2016) apontam que o AMH é utilizado para analisar o esgotamento ovariano da fêmea, constatado através do declínio de sua concentração no sangue, assim, apresentando potencial para estabelecer o tempo em que a utilização da fêmea não é mais pertinente dentro dos programas de PIVE.

## **5 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS NO ESTADO DO PARÁ**

Mundialmente, a transferência de embriões e aspiração folicular guiada por ultrassom apresentou um avanço de 16,7%, comparado ao ano de 2013, onde em particular o Brasil, produziu 70,8% dos embriões de FIV no mundo (IETS,2014). A região Norte possui o segundo maior rebanho brasileiro, sendo a única a apresentar crescimento em 2017. Dentre os dez municípios mais cotados em expansão em números absolutos nos últimos dez anos, sete encontram-se no estado do Pará. São Félix do Xingu (PA), líder nacional em 2017, teve crescimento do rebanho de 23,6% nos últimos dez anos. Em 2010, este município ultrapassou Corumbá (MS) no ranking municipal (IBGE, 2017).

Durante o período de 11 de março à 24 de maio de 2019, o laboratório acompanhado durante o estágio produziu um total de 2226 embriões, os quais foram destinados tanto para utilização em transferências à fresco, como foram submetidos à criopreservação. Visivelmente há um predomínio do uso da raça Nelore, tanto no processo de produção e comercialização quando pela valorização dos embriões devido aos altos preços alcançados nesta raça (PONTES et al., 2011). Contudo, do total obtido, 1262 embriões foram destinados à produção de corte, dividido entre as raças Nelore, Senepol e Tabapuã, e 964 embriões foram destinados a produção leiteira na raça Gir Leiteiro.

### **5.1 Aspiração guiada por ultrassonografia (OPU) e seleção de oócitos**

A aspiração é realizada com a doadora devidamente contida no tronco de contenção para bovinos e feita anestesia epidural utilizando agulha 40x12 e anestésico local a base de lidocaína. Posteriormente com a mão devidamente enluvada no reto do animal é inserido o transdutor vaginal com guia e agulha descartável acoplada na extremidade. Os ovários são localizados e tracionados até a extremidade do transdutor onde através da imagem gerada no monitor de ultrassonografia é feita a qualificação e aspiração guiada daqueles folículos que são julgados adequados (tamanho de 2 a 6mm). Após a coleta dos oócitos, estes eram devidamente transportados em tubo falcon 15 mL até o local reservado para seleção. Preferencialmente, o local destinado a montagem dos equipamentos para a seleção, deve ser separado do curral, com o aporte de uma mesa e com as mínimas condições higiênico-sanitárias. Os equipamentos julgados necessários para a realização do rastreamento desses oócitos são lupa, aparelho para banho maria, placas de Petri, pipetas, criotubos, cilindro com gás mistura padrão de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> e a transportadora de oócitos. Ao chegar, os oócitos passam

pelo filtro de separação com adição do meio DPBS aquecido, cuja filtragem tem como intuito fazer a separação de coágulos que possam ter sido resultados durante o momento da aspiração. Após isso, os oócitos são colocados sob a Placa de Petri riscada com gotas de meio de lavagem (ABS)<sup>®</sup>, onde irão ser avaliados e classificados em GI, GII, GIII, desnudos e citoplasma irregular. Seleciona-se preferencialmente os de GI, GII e GIII, que são colocados em criotubos contendo meio de maturação (ABS)<sup>®</sup>, passado pela mistura padrão de gás tampados com rolha de silicone, numerados e colocados na transportadora de oócitos. Ao término, os oócitos são devidamente transportados até o laboratório. A recepção dos oócitos no laboratório é feita conforme descrito no fluxograma, onde os criotubos são destampados e colocados na incubadora com temperatura e atmosfera adequada para completar o processo de maturação *in vitro* por um período de 22 até 24 h.

**Figura 5:** Técnico agropecuário realizando a classificação e seleção de oócitos



Fonte: AUTOR, 2019

## 5.2 Maturação *In Vitro*

A etapa de maturação, chamada de dia -1 (D -1), ocorria com os oócitos em meio de maturação (ABS)<sup>®</sup>, mantidos em incubadora com temperatura de 38,5° e atmosfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub> e 6% O<sub>2</sub> por um período de 24 horas.

## 5.3 Fertilização *In Vitro* e Preparo do Sêmen

A fertilização *in vitro*, chamada de dia 0 (D0), é compreendida pelo contato dos espermatozoides com os oócitos, e deve ser realizada até 24 horas após o início do processo de maturação. Os meios são antecipadamente preparados e aquecidos por até duas horas, e

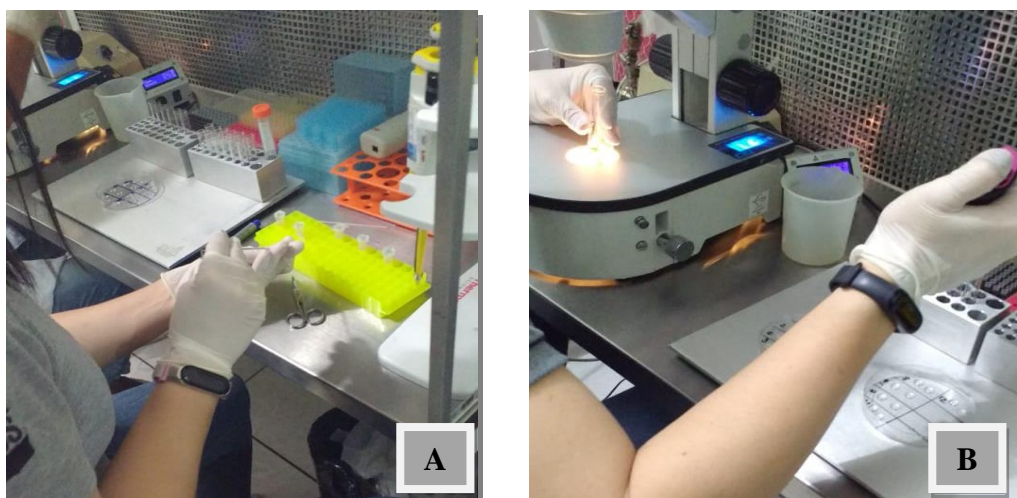


estes têm como finalidade a capacitação dos espermatozoides e facilitar a passagem do mesmo pela zona pelúcida. Os oócitos são colocados em placas contendo gotas de meio FIV (ABS)<sup>®</sup> o qual tem o intuito de retirar o excesso de meio de maturação, em seguida são transferidos para as placas de fertilização preparadas contendo as gotas do meio de fertilização (ABS)<sup>®</sup> e cobertas por 4 ml de óleo mineral, colocando-se até 30 oócitos por gota.

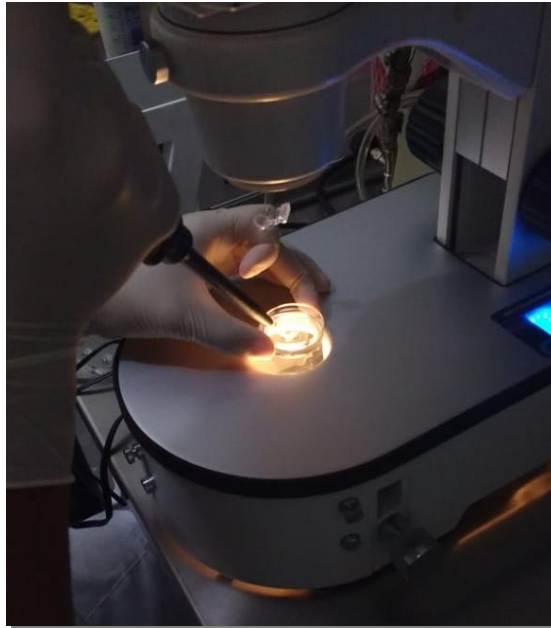
Simultaneamente, os espermatozoides são preparados, as doses escolhidas são descongeladas em banho maria 37° por 40 segundos, e dispostas em tubos eppendorfs (Figura 5 B) onde irão ser destinados à técnica escolhida para separação dos espermatozoides vivos dos demais componentes do sêmen e dos crioprotetores. As técnicas acompanhadas foram o gradiente Percoll e o lavado espermático. É importante ressaltar que, além do método adotado para preparação do sêmen e do tempo de co-incubação, outros fatores podem afetar a taxa de fecundação tais como, a dose inseminante, a interação touro-vaca e a diferença entre touros na capacidade de fecundar e produzir embriões. A variação individual de touros é um dos principais fatores que interferem na FIV e na produção de embriões. Sendo assim, torna-se crucial o teste e avaliação dos touros frente a diferentes oócitos de doadoras antes de destiná-lo à FIV.

Depois que o sêmen é preparado, os espermatozoides são adicionados às gotas de fecundação contendo os oócitos (Figura 6). Após esse procedimento, as placas contendo espermatozoides e oócitos vão para a incubadora com temperatura (38,5° C), atmosfera (6% O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>) e umidade adequados, por um período de 18 a 24 horas. Para que essa etapa obtenha êxito, é necessário que haja a completa e adequada maturação dos oócitos bem como a preparação apropriada dos espermatozoides.

**Figura 6:** A: Preparação do sêmen. B: Preparação dos oócitos



**Figura 7:** Momento da fertilização *in vitro* onde os espermatozoides são colocados em contato com os oócitos na gota de meio FIV (ABS)



Fonte: AUTOR, 2019

#### **5.4 Cultivo *In Vitro***

O cultivo *in vitro*, chamado dia 1 (D1), e é compreendido pela fase onde o zigoto será desnudo. Esta etapa é realizada um dia após a fertilização (24 horas), onde os possíveis zigotos formados a partir da fecundação, serão lavados e agitados com o auxílio de pipetas para desnudá-los, em seguida são colocados em placas contendo gotas de meio CIV (ABS)<sup>®</sup> cobertas por 4 ml óleo mineral, as quais foram preparadas e aquecidas antecipadamente por uma hora a 38,5°.

Assim, os zigotos permanecem nessas placas até o momento de serem envasados (D7) onde vão evoluir ao estágio de blastocistos, mantidos na incubadora com temperatura de 38,7°C e 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>.

## **5.5 Feeding**

Essa etapa é realizada quatro dias após o cultivo, com o intuito de contar as estruturas que estão clivadas, chamado de dia 4 (D4). Além disso, também é realizada a reposição do meio com utilizando o meio 2ºFeeding (ABS)<sup>®</sup>. É desejável que durante a contagem de estruturas clivadas, sejam observadas estruturas com desenvolvimento apresentando estágio de 8-16 células ou mórulas.

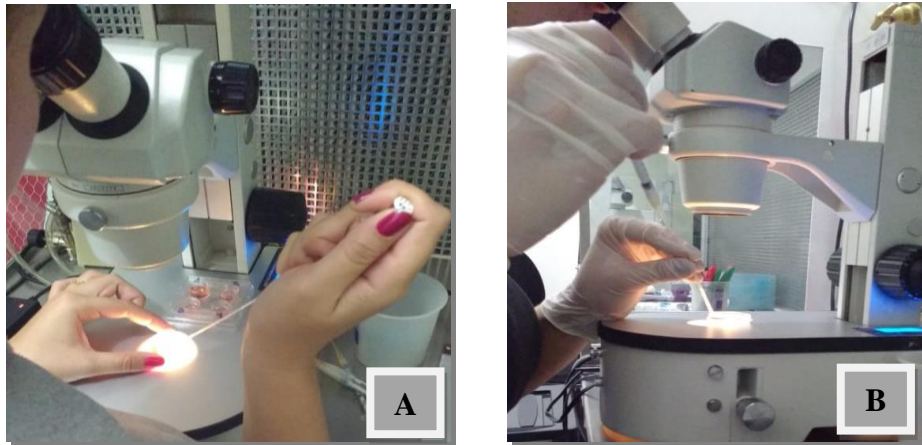
## **5.6 Previsão para Envase**

A previsão é realizada no dia 6 (D6), onde a finalidade é fazer a contagem dos possíveis embriões viáveis que serão envasados no D7. Na previsão considera-se principalmente estruturas com desenvolvimento a partir de blastocisto inicial.

## **5.7 Envase**

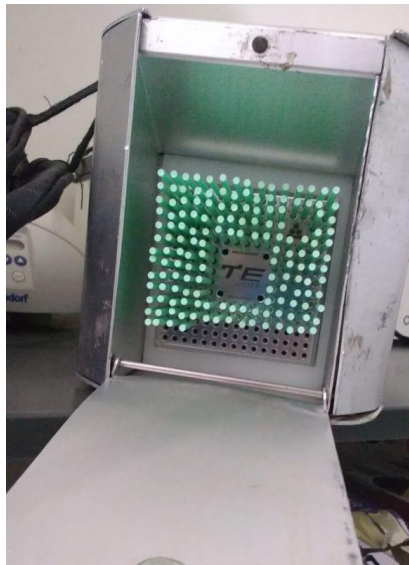
O envase ocorre no dia 7 (D7), onde os embriões serão preparados para serem transferidos. Os embriões são escolhidos e colocados em placas para envase contendo meio H-SOF (ABS)<sup>®</sup> e em seguida o envase é feito na palheta 0,25 ml, de tal forma que uma coluna central contendo o embrião e meio encontra-se separada das colunas nas extremidades por duas colunas de ar (Figura 7 A e B). As palhetas precisam ser devidamente identificadas para evitar equívocos no momento da transferência. A identificação é feita através de lacradores de plástico numerados os quais correspondem à numeração em planilha que contém o acasalamento correspondente àquele embrião específico e que acompanha a equipe de campo para o momento da transferência. Após envasados, os embriões são colocados na transportadora WTA (Figura 8) que possui bateria própria e mantém temperatura de 36,5° C, em seguida são entregues à equipe responsável pela transferência para a sua realização no mesmo dia.

**Figura 8: A e B:** Os embriões sendo envasados em palhetas de 0.25 ml com solução H-SOF (ABS)<sup>®</sup>



Fonte: AUTOR, 2019

**Figura 9:** Embriões em transportadora WTA aptos a serem transferidos



Fonte: AUTOR, 2019

## **5.8 Vitrificação e *Direct Transfer***

As técnicas de criopreservação podem ser aplicadas no D7 ou D8, onde a escolha dos embriões é baseada de acordo com a avaliação dos estádios em que os embriões se encontram,

frisando que só são destinados ao processo aqueles de grau I (Figura 13), ou seja, apenas embriões considerados de bons a excelentes.

A vitrificação é considerada um método de criopreservação imediato, onde após a preparação do embrião é colocado diretamente no nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>), não se fazendo necessário possuir um equipamento para a realização. Contudo, gera a etapa de desvitrificação seguido de envase, para assim serem transferidos. Em contrapartida, o *Direct Transfer* é um método de congelamento mais lento, o qual conta com a utilização de equipamento específico para a realização, onde os embriões já são congelados em palhetas adequadas para serem transferidos.

A vitrificação inicia-se com a preparação da placa de vitrificação (placa NUNC 4 poços), onde nos poços 1 e 2 é colocado meio S1M (ABS)<sup>®</sup> juntamente aos meios intracelulares (ABS)<sup>®</sup> e nos poços 3 e 4 é colocado meio Manutenção (ABS)<sup>®</sup>. Em seguida, seleciona-se os embriões a serem vitrificados e coloca-os nos poços 3 e 4. Transfere-se os embriões (no máximo 5 por vez) para o poço 1 durante 1 minuto, onde aos 30 segundos faz-se uma gota da solução presente no poço 2 separada em uma placa de Petri com marcação quadriculada. Próximo ao término do tempo determinado (aproximadamente aos 50 segundos) localiza-se os embriões e prepara para pegá-los. Ao completar 1 minuto, transfere os embriões do poço 1 para a gota na placa, sempre atento em levar junto um pouco da solução do poço 1. Nessa gota com solução do poço 2 (Figura 9 A), os embriões permanecem durante apenas 20 segundos, onde durante esse tempo são colocados na extremidade da OPS (Figura 9 B) e em seguida mergulhados diretamente no N<sub>2</sub> (Figura 10).

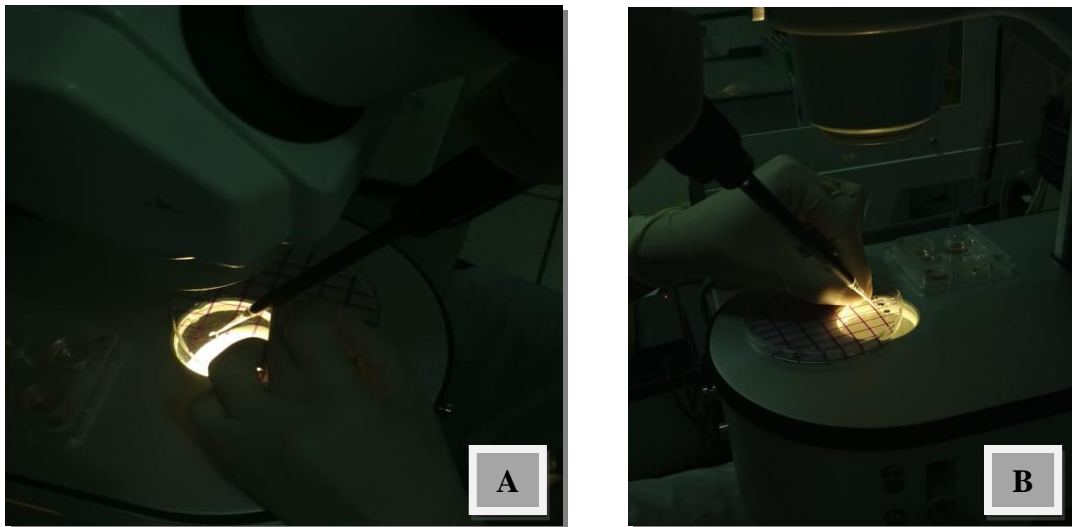
Depois de vitrificados, os embriões são colocados em uma raque devidamente identificada e armazenados em botijão de nitrogênio, por tempo indeterminado.

Já o *Direct Transfer* é realizado utilizando os meios H-SOF (ABS)<sup>®</sup>, T1 (ABS)<sup>®</sup> e T2 (ABS)<sup>®</sup>. Seleciona-se os embriões de qualidade grau 1 e são destinados a sequência de exposição aos meios citados. Em uma placa de Petri demarcada, faz-se 3 gotas das soluções: a primeira de H-SOF, a segunda T2+H-SOF e a terceira T1, como mostra a figura 11. Os embriões são colocados na primeira gota, com intuito de retirar o excesso de meio de CIV (ABS)<sup>®</sup>, em seguida são colocados na segunda gota por 1 minuto. Por fim, os embriões ao término do tempo já estarão contraídos e prontos para passar para a terceira gota. É importante ressaltar que deve-se tentar levar o mínimo de meio junto. Com todos os embriões

na terceira gota, inicia-se o envase nas palhetas, onde é realizado com o meio T1 (ABS)<sup>®</sup> de forma que fique uma coluna central contendo embrião e o meio, duas colunas de ar e mais duas colunas de meio nas pontas das palhetas. A importância de manter essa forma de envase dá-se principalmente por motivos de segurança, onde, durante o processo de congelamento o meio, mesmo com o uso dos crioprotetores, tende a se expandir. Sendo assim, as colunas de ar proporcionam que ocorra essa expansão, evitando a intercorrência da palheta vir a estourar. Além disso, as duas colunas de meio nas pontas servem como proteção e facilitam no momento da transferência, onde a primeira coluna de meio faz a lubrificação da passagem do embrião pela própria palheta, e a segunda coluna ajuda na expulsão do embrião da palheta.

Após envasados e lacrados com identificação do acasalamento, as palhetas são colocadas na máquina de congelar embriões (TK-3000 SE compacta) contendo nitrogênio po40 minutos (Figura 11 B). Em seguida, são colocadas em uma raque identificada e armazenadas embotijão com nitrogênio por tempo indeterminado.

**Figura 10:** **A:** Embriões sendo colocados na gota de solução do poço 2 na placa de Petri. **B:** Embriões sendo colocados na ponta da OPS para serem vitrificados.



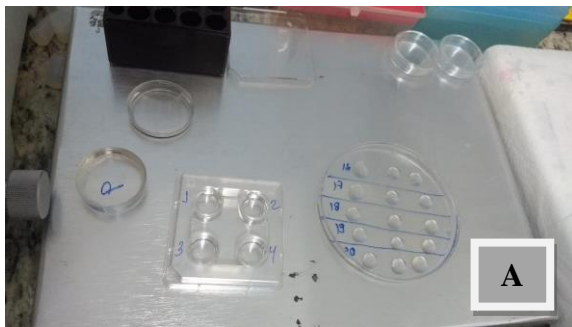
Fonte: AUTOR, 2019

**Figura 11:** OPS contendo os embriões sendo colocada diretamente no Nitrogênio Líquido (N<sub>2</sub>.)



Fonte: AUTOR, 2019

**Figura 12:** **A:** Preparação das gotas em Placa de Petri para realização do protocolo de *Direct Transfer*.  
**B:** Palhetas envasadas com os embriões dentro da máquina de congelar embriões (TK-3000 SE compacta)



Fonte: AUTOR, 2019

## 5.9 Desvitrificação

Quando o proprietário solicita a utilização dos embriões que foram vitrificados, torna-se necessária a etapa de desvitrificação, a qual pode ser realizada tanto no laboratório quanto à

campo. Esse processo inicia-se com a seleção das OPS contendo os embriões escolhidos que são transferidas e mantidas em um isopor contendo  $N_2$ . Prepara-se a placa para reaquecimento (placa NUNC 4 poços), utilizando meios S1M (ABS)<sup>®</sup> e Manutenção (ABS)<sup>®</sup>. Seleciona-se a primeira OPS a ser descongelada e mergulha-a no poço 1 (Figura 12). Ao observar que todos os embriões foram retirados da OPS (Figura 13), deve-se passá-los imediatamente para o poço 02. Os poços 01 e 02 contêm a mesma concentração das soluções, por isso o tempo total de permanência dos embriões entre os dois poços deve ser de 5 minutos. Aos 5 minutos, retira-se os embriões do poço 02 e são transferidos para o poço 03, no qual permanecerão por mais 5 minutos. Em seguida, os embriões são colocados no poço 4, onde mantém-se até o envase.

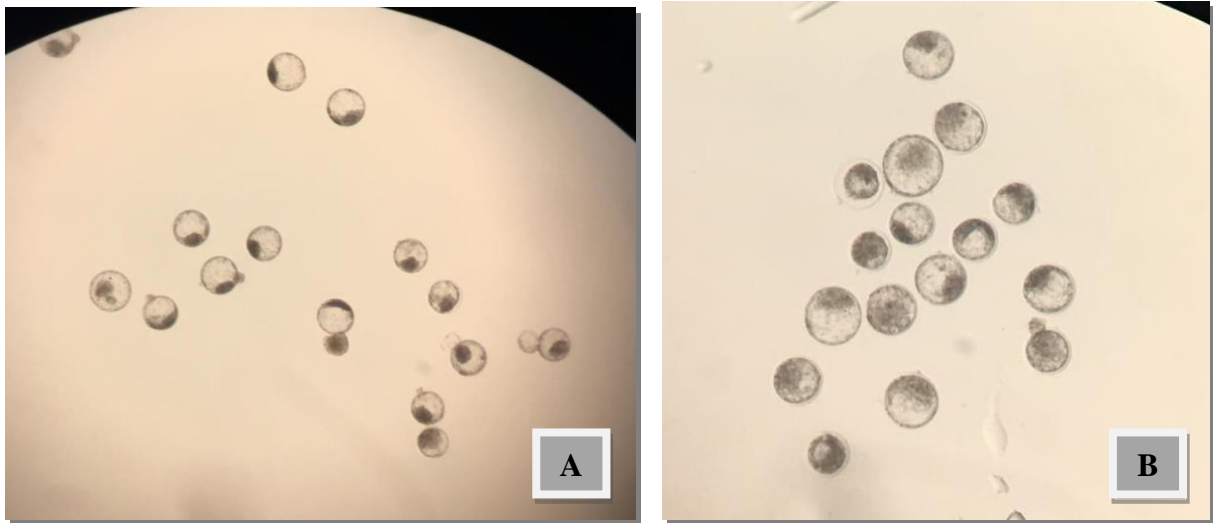
**Figura 13:** OPS contendo os embriões selecionados iniciando o processo de descongelamento sendo mergulhada na solução do poço 1.



Fonte: AUTOR, 2019



**Figura 14: A e B: Blastocistos bovinos**



Fonte: AUTOR, 2019

## **6 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES E DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO**

Os embriões após envasados e colocados nas transportadoras são entregues a responsabilidade do médico veterinário escalado para realizar a transferência. A rotina acompanhada possibilitou fazer a montagem do embrião a ser transferido, onde era retirado o laque da palheta contendo o embrião colocado na bainha acoplada ao inovulador específico para bovinos e enluvados com a camisinha sanitária, em seguida era entregue ao médico veterinário para a realização da transferência.

As receptoras passam por um protocolo hormonal 18 dias antes da transferência, o qual não foi possível ser acompanhado durante o estágio curricular devido a logística da empresa, porém é realizado da seguinte forma: no início do protocolo (Dia 0) é realizado o implante intravaginal contendo progesterona e administrado benzoato de estradiol; após 9 dias (Dia 9) é feita a retirada do implante e administração de cipionato de estradiol, prostaglandina (PGF2 $\alpha$ ) e Gonadotrofina coriônica equina (eCG); e logo após, com 9 dias (Dia 18) as receptoras são destinadas à transferência. No dia da transferência eram julgadas aptas para receber o embrião aquelas de bom escore corporal e as quais fosse detectada a presença do corpo lúteo em algum dos ovários.

Os diagnósticos de gestações proposto pela a unidade, são o DG precoce que é realizado com 30 dias após a transferência e o DG definitivo que é realizado 60 dias após a transferência. É realizado através de palpação retal, mas quando disponível o equipamento, também podendo ser realizado com o auxilio de ultrassonografia.

**Figura 15: A:** Bancada com materiais onde os embriões são montados. **B:** Embriões sendo montados na bainha e acoplados ao inovulador.



Fonte: AUTOR, 2019

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A rotina prévia na graduação com a área escolhida para trilhar o Estágio Curricular Supervisionado foi responsável por nortear o esforço em segui-la. Contudo, o local descrito, não só permitiu que fosse possível acompanhar toda a rotina que é descrita na Reprodução Animal como já esperado, mas também, agregou valores no conhecimento adquirido na universidade e trouxe a realidade prática da importância da aplicação das biotecnologias na reprodução.

Foi de suma importância a obtenção de uma visão mais ampla, prática e rotineira da profissão, bem como, proporcionar o entendimento funcional do trabalho em equipe, e como este se torna fundamental para atingir o sucesso dos resultados.

## REFERÊNCIAS

- AMARAL, T. N.; SANTOS, K. J. G.; SANTOS, A. P. P.; LOPES, J. C. S.; RAMOS, P. H. S.; et al. Avaliação da produção *in vitro* embriões a partir de espermatozoides frescos e congelados. **Anais do Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG (CEPE)**. v. 3, p. 1-4, 2016. Disponível em: <<http://www.anais.ueg.br/index.php/cepe/article/view/8317/5776>>.
- AMINI, E. D. V. M.; ASADPOURP, R.; ROSHANGARP, L.; JAFARI-JOOZANIP, R. Effect of linoleic acid supplementation on *in vitro* maturation, embryo development and apoptotic related gene expression in ovine. **Reprod Bio Med**, v.14, p. 255-262, Tabriz, Irã, 2016
- ANDRADE, G. A.; FERNANDES, M. A.; KNYCHALA, R. M.; PEREIRA JUNIOR, M.V., OLIVEIRA, A. J.; NUNES, D. P.; BONATO, G. L.; SANTOS, R. M. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 36, n. 1, p. 66-69, 2012. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v36n1/pag66-69.pdf>>.
- ARAÚJO, M. S.; VOLPATO, R.; LOPES, M. D. Produção de embriões bovinos *in vitro* com sêmen sexado. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 11, n. 3, p. 8-15, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/141300>>.
- ASSUMPÇÃO MEOD, HAIPECK K, LIMA AL, MELLO MRB, OLIVEIRA LJ, OLIVEIRA VP, TAVARES LMT, VISINTIN JA. Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.39, p.149-156, 2002.
- BARRETTO, L. S. S. **Avaliação dos efeitos da inibição da maturação nuclear e de antioxidantes sobre a maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário bovino *in vitro***. 2007, f. 113 Tese (doutorado) - Universidade Estadual
- BARROSO, G.; VALDESPIN, C.; VEGA, E.; KERSHENOVICH, R.; AVILA, R.; et al. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. **Fertility and Sterility**, v. 92, p. 835-848, 2009. Disponível em: <[https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(09\)01351-X/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(09)01351-X/fulltext)>. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.06.030.
- BARUSELLI, P. S.; VIEIRA, L. M.; BATISTA, E. O. S.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; GIMENES, L. U.; TORRES-JUNIOR, J. R. S.; MARTINS, C. M.; SÁ FILHO, M. F.; BO, G. A. Produção *in vitro* de embrião bovino Atualização sobre estratégias de produção de embriões. **Anais...** Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Gramado-RS, p.52-60. 2015.

BATISTA, J. F.; SILVA, L. F.; LAZARI, L. P.; OLIVEIRA LEAL, M. G.; SOUZA, M. M.; et al. Avaliação morfológica e nuclear de oócitos bovinos imaturos, obtidos de ovários com e sem a presença de corpo lúteo. **Colloquium Agrariae**, v. 12, n. 2, p.1-5, 2016. Disponível em: <<http://revistas.unoeste.br/revistas/ojs/index.php/ca/article/view/1764/1728>>. doi: 10.5747/ca.2016.v12.n2.a133.

BERNAL, S.; GONELLA, A.; VALBUENA, D.; MENDONZA, R.; MOLINA, J.; CHACÓN, L. Effect of age and coasting period on oocytes quality and their *in vitro* development from prepubertal cattle. **Revista MVZ Córdoba**. Córdoba, v. 16, n. 2, p. 2499-2506, 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-02682011000200007&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682011000200007&lng=en&nrm=iso)>.

BERTAGNOLLI, A. C.; GONÇALVES, P. B. D.; GIOMETTI, I. C.; COSTA, L. F. S.; OLIVEIRA, J.F. C.; GONÇALVES, I. D. V.; BARRETO, K. P.; EMANUELLI, I. P.; BORGE, L. F. K. Interação entre células do *cumulus* e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 56, n.4, p.488-496, 2004.

BUENO, P.; A. BELTRAN, M. P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Ver. Elet. Med. Vet.**, n.11, p.1-7, 2008

CAVALIERI, F. L. B.; ANDREAZZI, M. A.; COLOMBO, A. H. B.; EMANUELLI, I. P.; MORESKI, D. A. B.; et al. Estudo Sobre o Cultivo In Vitro de Embriões Bovinos Durante o Transporte. **Ars Veterinaria**, v. 31, n. 1, p. 07-11, 2015. Disponível em: <<http://arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/view/849>>. doi: 0.15361/2175-0106.2015v31n1p07-11.

CAVALIERI, F. L. B.; MOROTTI, F.; COLOMBO, A. H. B.; ANDREAZZI, M. A.; EMANUELLI, I. P.; et al. Improvement of bovine *in vitro* embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. **Theriogenology**, v. 117, p. 57-60, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X17305678?via%3Dihub>>. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.026.

CHAVES, R. N.; DUARTE, A. B. G.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J.R. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 34, p. 37-49, 2010.

CORRÊA, G. A. **Tensão de oxigênio durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos: efeito na produção e expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo**. 2006. 76f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade de Brasília, Brasília – DF.

CUMMINS, J.M. Cytoplasmatic inheritance and this implications for animal biotechnology. **Theriogenology**, v. 55, p. 1381-1399, 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X01004897?via%3Dihub>>. doi: 10.1016/S0093-691X(01)00489-7.

CURRIN, L.; MICHALOVIC, L.; BELLEFLEUR, A. M.; GUTIERREZ, K.; GLANZNER, W.; et al. The effect of age and length of gonadotropin stimulation on the *in vitro* embryo development of Holstein calf oocytes. **Theriogenology**, v. 104, p. 87-93, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X17303965?via%3Dihub>>. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.08.011.

DAYAN A. Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação in vitro. 2001. 56f. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP)**, 2001.

De VRIES, A.; OVERTON, M.; FETROW, J.; LESLIE, K.; EICKER, S.; ROGERS, G. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. **Journal Dairy Science**, v. 91, n. 2, p. 847-856, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030208714292?via%3Dihub>>. doi: 10.3168/jds.2007-0536.

DODE, M. A. N.; ADONA, P. R.; RODOVALHO, N. C. M. Retenção da meiose de ovócitos bovinos em líquido folicular de folículos de vários tamanhos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 28, n.1, p.241, 2000.

DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões na espécie bovina – Uma promissora ferramenta de multiplicação animal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 26, maio/junho, 2002.

FERREIRA, M. C. N.; MIRANDA, R.; FIGUEIREDE, M. A.; COSTA, O. M.; PALHANO, H. B. Impacto da condição corporal sobre a taxa de prenhez de vacas da raça nelore sob regime de pasto em programa de inseminação artificial em tempo fixo (iatf). **Ciências Agrárias**. Londrina, v. 34, n. 4, p. 1861-1868, 2013. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/html/4457/445744122032/>>. doi: 10.5433/1679-0359.2013v34n4p1861.

FONSECA, J. F.; SOUZA, J. M. G.; CAMARGO, L. S. A. Produção de oócitos e embriões de pequenos ruminantes: passado, presente e futuro. **Anais...** Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, v. 24, p. 85-96. 2010.

GALLI, C. & LAZZARI, G. 2000. **Practica laspectsof IVM/IVF in cattle.** *Journal Reproduction Science*, 42, 371-379.

GIMENES, L. U.; FERRAZ, M. L.; FANTINATO-NETO, P.; CHIARATTI, M. R.; MESQUITA, L. G.; et al. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect *in vitro* embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. **Theriogenology**, v. 83, n 3, p. 385-393, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X14005391?via%3Dihub>>. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.09.030.

GONÇALVES PBD, BARRETA MB, SANDRI LR, FERREIRA R, ANTONIAZZI AQ. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31, p.212-217, 2007.

GONÇALVES PBD, FIGUEREDO JR, FREITAS VJF. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. **2. Ed. São Paulo: Roca**, 2008, 395p

GONÇALVES, P. B. D., VISINTIN, J. A., OLIVEIRA, M.A. L., MONTAGNER, M. M. & COSTA, L. F. S. 2002. Produção *in vitro* de embriões. In: Gonçalves, P. B. D., R., F. J. & Freitas, V. J. F.(eds.) *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. Roca, São Paulo, Brasil.

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.212-217, abr./jun. 2007. Disponível em:< <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/212.pdf>>. Acesso em: 16/03/2016.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. 2ª ed. London: CABI Publishing,p.548, 2003.

GUERREIRO, B. M.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F.; RODRIGUES, C. A.; CASTRO NETTO, A.; SILVEIRA, C. R. A.; BAYEUX, B. M.; DIAS, E. A. R.; MONTEIRO, F. M.; ACCORSI, M.; LOPES, R. N. V. R.; BARUSELLI, P. S. Plasma anti-mullerian hormone: na endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. **Domest Anim Endocrinol.**, v. 49, p.96-104, 2014.

HAFEZ, B e HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7ª ed. Barueri- SP: Manole, 2004.

HUMBLLOT P, HOLME P, LONERGAN P, WRENZYCKI C, LEQUARRE AS, JOLY CG, HERRMANN D, LOPES A, RIZOS D, NIEMANN H, CALLESEN H. **Effect of stage of**

**follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes.** *Theriogenology*, v.63, p1149-1166. 2005.

IBGE. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 16/03/2016.

IETS. 2013 Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals.

**Embryo Transfer Newsletter**, v. 32 (4), p. 14-26, 2014 .

IETS. **International embryo transfer society**. Statistics and data retrieval committee report. Embryo Transfer Newsletter. 2014.

IRITANI A, NIWA K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. **J Reprod Ferti**, v.50, p.119-121, 1977.

KOUAMO, J.; DAWAYE, S. M.; ZOLI, A. P.; BAH, G. S. Evaluation of bovine (*Bos indicus*) ovarian potential for in vitro embryo production in the Adamawa plateau (Cameroon). **Open Veterinary Journal**. v. 4, p. 128–136, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC26623353/>>. doi:

LANDRY, D. A.; BELLEFLEUR, A. M.; LABRECQUE, R.; GRAND, F. X.; VIGNEAULT, C.; et al. Effect of cow age on the *in vitro* developmental competence of oocytes obtained after FSH stimulation and coasting treatments. **Theriogenology**, v. 86, n. 5, p. 1240-1246, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X16301030?via%3Dihub>>. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.064.

LANDRY, D. A.; ROSSI-PERAZZA, L.; LAFONTAINE, S.; SIRARD, M. A. Expression of atresia biomarkers in granulosa cells after ovarian stimulation in heifers. **Reproduction**, v. 156, n. 3, p. 239-248, 2018. Disponível em: <<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/156/3/REP-18-0186.xml#bib18>>. doi: 10.1530/REP-18-0186

LOIOLA, M. V. G.; CHALHOUB, M.; RODRIGUES, A. S.; FERRAZ, P. A.; BITTENCOURT, R. F.; et al. Validação de um Programa de Produção In Vitro de Embriões Bovinos com Transporte de Oócitos e de Embriões por Longas Distâncias. **Ciência Animal Brasileira**. Goiânia, v. 15, n. 1, p. 93-101, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cab/v15n1/12.pdf>>. doi: 10.5216/cab.v15i1.23327>.

MACHADO, G.M. **Efeito de diferentes protocolos de Percoll na qualidade espermática e na produção in vitro de embriões bovinos**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 67p. Dissertação de Mestrado. Disponível em: <[http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/4678/1/2009\\_GrazieliMarinheiroMachado.pdf](http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/4678/1/2009_GrazieliMarinheiroMachado.pdf)>. Acesso em: 25/02/2016.



MARTINEZ, I. N.; SOUZA, L. C. **Transferência de embrião e fertilização *in vitro* (FIV) em bovinos**. 2007. 88 f. Pós-Graduação (Especialização em Produção e Reprodução Bovina)– Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2007.

MELO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte- MG, v.40, n.2, p.58-64, 2016

MENCHACA, A.; BARRERA, N.; DOS SANTOS NETO, P. C.; CUADRO, F.; CRISPO, M. Advances and limitations of *in vitro* embryo production in sheep and goats. **Anim. Reprod.**, V.13, p.273-278, 2016.

MONTEIRO, F. M.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; BAYEUX, B. M.; ACCORSI, M.; et al. Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more *in vitro* embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. **Theriogenology**, v. 90, p. 54-58, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X16305350?via%3Dihub>>. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.11.002.

MOTA, L.H.C.M.; BRANCO, M. de A.C.; CARVALHO, Y.N.T.; EVANGELISTA, L.S. de M.; CORREIA, H.S.; NASCIMENTO, I.M.R.; SOUZA, J.A.T. Influência da somatotropina recombinante bovina (rbST) na produção *in vitro* de embriões em vacas leiteiras: uma revisão. **PUBVET**, Londrina, v. 6, n. 32, Ed. 216, art. 1456, 2012. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/imagens/artigos/1412013-092514-evangelista1456.pdf>>. Acesso em: 23/02/2016.

NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v.55, p.1291-1301, 2001.

PALMA, G. A. Producción *in vitro* de embriones bovinos. In: **Biotecnología de la reproducción**. 2ª ed. Mar del Plata - Argentina, p 313-380, 2008.

Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal – SP.

PENITENTE FILHO, J.M. **Produção de embriões bovinos *in vivo* e *in vitro***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa – Departamento de Zootecnia, 2011. Disponível em: <<file:///E:/artigos%20tcc/PIV/Apostila%20Semana%20do%20Fazendeiro%20-%20Produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20embri%C3%B5es%20bovinos%20in%20vivo%20e%20in%20vitro.pdf>>. Acesso em: 15/05/2016.

PONTES, J. H. F.; MELO STERZA, F. A.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; PRADO, R. B.; KOIVISTO, M. B.; CARREIRA, J. T.; PERRI, S. H. V.; RODRIGUES, L. H.; et al. Efeito da utilização de diferentes diluidores para a produção *in vitro* de embriões bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 64, n. 5, p. 1118-

1126, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v64n5/v64n5a05.pdf>>. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352012000500005>.

Realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, Supl. 3, p. 915-924, 2007

REIS, A.; METELO, R.; SANTOS, P.; MOREIRA da SILVA, F. Efeito da estrutura ovárica e da idade de bovinos da raça Holstein Friesian na quantidade e qualidade de ovócitos e de embriões produzidos *in vitro*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 5, p. 629-636, 2006. Disponível em:

<<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26571>>. doi: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2006.26571

RIZOS D, LONERGAN P, WARD F, DUFFY P, BOLAND MP. **Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization, or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality**. *Mol Reprod Devel*, v.61, p.234-248, 2002.

ROOVER, R.; FEUGANG, J M. N.; BOLS, P. E. J.; GENICOT, G.; HANZEN, C. H. Effects of Ovum Pick-up Frequency and FSH Stimulation: A Retrospective Study on Seven Years of Beef Cattle *In Vitro* Embryo Production. **Reprod Dom Anim.**, v.10, p. 1439-1531, 2007.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p. 229-233, 2007. Disponível em:<

<http://www.sbz.org.br/revista/artigos/9021.pdf> >. Acesso em: 14/12/2015.

SALES, J. N. S.; IOGUMA, L. T.; BATISTA, R. I. T. P; QUINTÃO, C. C. R; GAMA, M.A. S.; et al. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and *in vitro* embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n.5, p. 3086-3099, 2015.

Disponível em: <[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(15\)00137-X/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(15)00137-X/fulltext)>. doi:10.3168/jds.2014-8858.

SANCHES, B. V.; RUBIN, K. C. P.; SENEDA, M. M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1640-1646, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X11000057?via%3Dihu> . doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.12.026.

SANGILD, P.T., SCHMIDT, M., JACOBSEN, H., et al. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from *in vitro* produced bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v.62, p.1495-1504, 2000.

SARTORI, R. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 32-40, 2016. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X16300449?via%3Dihub>>. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.016.

SCANAVEZ, A. L.; CAMPOS, C. C.; SANTOS, R. M. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 3, p. 722-728, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v65n3/17.pdf>>.

SENEDA, M.M.; RUBIN, K.C.P.; BLASCHI, W.; LISBOA, L.A.; PONTES, J.H.F. Utilização de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para a aspiração folicular transvaginal guiada pela ultra-sonografia. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 168-175, 2005. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/recmvz/article/viewFile/3137/2339>>. Acesso em: 01/03/2016.

SERAFIM, P. R.; GOMES, L. P. M.; GOMES, G. M.. CRESPILO, A. M. Sêmen bovino sexado: A produção in vitro de embriões pode ser influenciada pelo touro doador do material genético? **Revista de Saúde**, v. 9, n. 1, p. 04-08, 2018. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/325916202\\_Semen\\_bovino\\_sexado\\_A\\_producao\\_in\\_vitro\\_de\\_embrioes\\_pode\\_ser\\_influenciada\\_pelo\\_touro\\_doador\\_do\\_material\\_genetico](https://www.researchgate.net/publication/325916202_Semen_bovino_sexado_A_producao_in_vitro_de_embrioes_pode_ser_influenciada_pelo_touro_doador_do_material_genetico)>. doi: 10.21727/rs.v9i1.1298.

SILVA, J. B.; PANAINO, T. R.; TAMM, M. A.; LIRA, P.; ARÊAS, P. C. F.; MANCEBO, A. C. A.; SOUZA, M. M.; ANTUNES, R. A.; SOUZA, M. C. B. Prediction of metaphase II oocytes according to different serum Anti-Mullerian hormone (AMH) levels in antagonist ICSI cycles. **JBRA Assist. Reprod**, v.20, p. 222-226, 2016.

SILVA, J. C. B.; FERREIRA, R. M.; MATURANA FILHO, M.; NAVES, J. R.; SANTIN, T.; et al. Use of FSH in two different regimens for ovarian superstimulation prior to *ovum pick up* and *in vitro* embryo production in Holstein cows. **Theriogenology**, v. 90, p. 65-73, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X16305568?via%3Dihub>>. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.11.016.

STADNIK, L.; ATASEVER, S.; DUCHÁČEK, J. Effects of body condition score and daily milk yield on reproduction traits of Czech Fleckvieh cows. **Animal Reproduction**. v.14, p.1264-1269. 2017. Disponível em: [http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14s1/p1264-1269%20\(AR944\).pdf](http://www.cbpa.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v14/v14s1/p1264-1269%20(AR944).pdf)>. doi: 10.21451/1984-3143-AR944.

SU, L.; YANG, S.; HE, X.; LI, X. MA, J.; et al. Effect of Donor Age on the Developmental Competence of Bovine Oocytes Retrieved by Ovum Pick Up. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 184-189, 2012. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1439-0531.2009.01349.x>>. doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01349.x.

TAKAHASHI T, SASAKI K, SOMFAI T, NAGAI T, MANABE N, EDASHIGE K. N, N-Dimethylglycine decreases oxidative stress and improves in vitro development of bovine embryos. *J Reprod Dev*, v.62, p. 209-12, 2016.

TESARIK, J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. **Reproduction Biomedicine Online**, v. 10, p. 226-230, 2005. Disponível em: <[https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(10\)61798-1/pdf](https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(10)61798-1/pdf)>. doi: 10.1016/S1472-6483(10)61798-1.

TORRES, H. A. L.; TINEO, J. S. A.; RAIDAN, F. S. S. Influência do escore de condição corporal na probabilidade de prenhez em bovinos de corte. **Archivos de Zootecnia**, v. 64, n. 247, p. 255-260, 2015. Disponível em: <<http://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/view/403/382>>.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M. de A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.100-109, abr./jun. 2008. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB152%20Varago%20pag100-109.pdf>>. Acesso em: 24/02/2016.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, Belo Horizonte, v. 36, p. 100-109, 2008.

VERNUNFT, A.; SCHWERHOFF, M.; VIERGUTZ, T.; DIEDERICH, M.; KUWER, A. Anti-Muellerian hormone levels in plasma of Holstein-Friesian heifers as a predictive parameter for ovum pick-up and embryo production outcomes. **Journal of reproduction and development**, v.61, p.74-79, 2015.

VIANA J. H. M. e CAMARGO L. S. A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, Supl. 3, p. 915-924. 2007

VIEIRA, L. M.; RODRIGUES, C. A.; NETTO, A. C.; GUERREIRO, B. M.; SILVEIRA, C. R. A.; et al. Efficacy of a single intramuscular injection of porcine FSH in hyaluronan prior to *ovum pick-up* in Holstein cattle. **Theriogenology**, v. 85, n. 5, p. 877-886, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X15006019?via%3Dihub>>. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.10.036.

VIEIRA, L. M.; RODRIGUES, C. A.; NETTO, A. C.; GUERREIRO, B. M.; SILVEIRA, C. R. A.; et al. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve *in vitro* embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 82, n. 2, p. 318-324, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X14001927?via%3Dihub>>. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.04.013.

WRENZYCKI, C. Sistemas de cultivo *in vitro*: quão longe estamos das condições ideais?. **Anais...** Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, v.30, p. 155-159. 2016.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; KESKINTEPE, L.; MARTINS, A.; SIRISATHIEN, S.; BRACKETT, B.; NIEMANN, H. Effect of culture system and protein supplementation on mRNA expression. In pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction Update.**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 893-901, 2001.

YANG X, JIANG S, FOOTE RH. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. **Mol Reprod Devel**, v.34, p.94-100, 1993.

ZULLO G, ALBERO G, NEGLIA G, DE CANDITIIS C, BIFULCO G, CAMPANILE G, GASPARRINI B. L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine *in vitro*-produced embryos. **Theriogenology**, v.85, p.668-97, 2016.