



JOÃO PEDRO BARCELO DE MELO

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA EMPRESA
ABS PECPLAN IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA
UNIDADE XINGUARA - PA**

**LAVRAS – MG
2023**

JOÃO PEDRO BARCELO DE MELO

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA EMPRESA ABS PECPLAN
IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA
UNIDADE XINGUARA – PA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte
das exigências do Curso de Medicina
Veterinária, para a obtenção do título de
Bacharel em Medicina Veterinária.

Prof. PhD. José Camisão de Souza
Orientador

**LAVRAS – MG
2023**

JOÃO PEDRO BARCELO DE MELO

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA EMPRESA ABS PECPLAN
IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA
UNIDADE XINGUARA – PA**

**SUPERVISED INTERNSHIP CARRIED OUT IN THE COMPANY ABS PECPLAN
IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA
UNITY OF XINGUARA - PA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Medicina Veterinária, para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

APROVADO em 08/03/2023

Prof. PhD. José Camisão de Souza

M. V. Lucas Araujo Lemos

Zootec. Vinicius Dutra Vaz

Prof. PhD. José Camisão de Souza
Orientador

**LAVRAS – MG
2023**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e ao Senhor Bom Jesus De Matozinhos pela benção e proteção divina. Agradeço aos meus pais, Vicente e Viviane, por toda educação, carinho, amor, e imensuráveis esforços para que eu pudesse conquistar meus objetivos. Agradeço ao meu irmão, Gustavo, por ser uma das minhas referências em dedicação, sensatez e foco. Aos meus avós, Maria e Antônio (em memória), por toda criação, humildade e sentimento. A todos meus tios, tias, primos e primas que se fizeram presentes em toda trajetória. Ao meu padrinho e amigo Jorge por toda parceria e apoio. Agradeço ao grande amigo Ilderson por se fazer presente e ser um grande incentivador do meu progresso.

Aos meus amigos de longa data, Leonardo, João Neto, Ormeu, Eduardo, Aron, Marcos Vinicius, Rafael, Clark, Gabriel, estes que são provas de que a distância não implica na ausência e sempre acompanharam minha evolução.

Aos irmãos que o sistema republicano me proporcionou através da minha casa, República Refúgio. Obrigado aos fundadores e doutores por todos ensinamentos, história, legado e honra repassados. Tenho uma dívida infinita com vocês, em especial aos ícones Marcelo (Sargento), Gabriel (O gorda), William (Avatar), Paulo César (Popaye), Rodolfo (Rods), Everson (Padre) e Luiz Fernando (Xinxá).

Aos amigos e companheiros do melhor período da UFLA, 2017/1, Gilberto (Fada), Venicius (Pateta), Leticia (Tati), Bruna (Dopamina), Gabriela (Nemo), Maria Júlia (Faminta), Fábio (Dadinho), Mateus (Querubim), Lucas (Cena), Thomas (Slide), Leonardo (Monalisa), Ana Carolina (Rapadura) e aos demais. Companheiro é companheiro e o restante já sabemos.

Agradeço a amiga Lara, pelas incansáveis horas de estudos, trabalhos e apoio durante a graduação.

Aos amigos JyJ, irmãos e companheiros que, através do sistema republicano, se tornaram apoio, figuras de inspiração e determinação, fontes de aprendizado. Agradeço a Otávio (Capivara), Vinicius (Zangado), Miron (Tião), Lucas (Saça), Pedro (Cossaku), João Antônio (Fimose), Vitor (Figuera), Brendo (Zangão) e Vitor (Sperto).

Agradeço a toda equipe ABS unidade Xinguara - PA, em especial os Médicos Veterinários Layson, Emerson Faria, Gabriel, Sávio e selecionador Elisnaldo, por me proporcionarem a maior e melhor experiência de estágio. Com toda certeza, o profissional que me tornarei, carregará um pouco da essência e excelência que absorvi de vocês!

Agradeço a todos aqueles, que mesmo não citados, se fizeram presente durante essa caminhada e contribuiram para que eu pudesse estar alcançando este tão almejado objetivo.

RESUMO

Neste trabalho foi realizada uma revisão de literatura que tratou do processo de reprodução de bovinos no Brasil. Identificou-se que esse processo tem sido realizado, principalmente, a partir de fertilização *in vitro*, uma técnica que permitiu um grande avanço na reprodução e grande aumento do rebanho bovino no país, fazendo com que esse tipo de negócio se tornasse essencial para o crescimento da economia nacional. Foram identificadas todas as etapas para a realização de uma fertilização *in vitro*, identificando como deve ser feita a preparação do animal e demais procedimentos essenciais para a realização do mesmo. O entendimento de cada etapa da fertilização *in vitro* foi alcançado com o apoio de diversos autores que pesquisam o tema e identificam qual a maneira ideal de realizar esse procedimento, assegurando o máximo de sucesso possível.

Palavras-chave: agronegócio, Fertilização *in vitro*, reprodução de bovinos.

ABSTRACT

In this work, a literature review was carried out that dealt with the process of reproduction of bovines in Brazil. It was identified that this process has been carried out, mainly, from *in vitro* fertilization, a technique that allowed a great advance in the reproduction and a great increase in the bovine herd in the country, making this type of business essential for the growth of the national economy. All steps for carrying out *in vitro* fertilization were identified, including how the animal should be prepared and other essential procedures. The understanding of each stage of *in vitro* fertilization was acquired with the support of several authors whose research in the subject and identification of the ideal ways to conduct the procedures involved in the whole process of the use of IVP bovine embryos, ensuring the maximum possible success.

Keywords: agribusiness, *in vitro* fertilization, bovine reproduction.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Casuísticas.....	22
Tabela 2 – Faixa de pressão por bomba utilizada.....	29
Tabela 3 – Possibilidades para lavagem dos oócitos.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fachada do escritório ABS unidade Xinguara – PA.....	12
Figura 2 – Recepção do laboratório e sala de administração.....	12
Figura 3 – Almojarifado de materiais utilizados no laboratório e campo.....	13
Figura 4 – Sala de armazenamento de botijões e ao fundo laboratório para produção <i>in vitro</i>	14
Figura 5 – Fazenda localizada no Sul do estado do Pará.....	14
Figura 6 – Equipe de transferência de embriões em fazenda localizada no distrito de Três Poderes – Marabá / PA.....	14
Figura 7 – Avaliação ginecológica de receptoras destinadas a TETF.....	16
Figura 8 – Fluxograma do protocolo de sincronização de ovulação em receptoras de 3 manejos com descrição dos dias de tratamento e fármacos a serem utilizados.....	17
Figura 9 – A) Equipamento de ultrassonografia para realização do procedimento de aspiração folicular. B) Aspiração folicular guiado por ultrassom. C) Seleccionador realizando seleção dos oócitos aspirados no procedimento em laboratório a campo. D) Oócitos.....	18
Figura 10 – Oócitos selecionados a campo.....	19
Figura 11 – A) Mesa montada a campo com material utilizado na TE: transportadora, inculadores, bainhas, camisinha sanitária, anestésico, luvas de palpação.....	20
Figura 12 – Transportadora contendo palhetas envasadas com embriões.....	21
Figura 13 – Procedimento de diagnóstico de gestação sendo realizado por meio da palpação transretal guiada por aparelho de ultrassonografia (US).....	22

LISTA DE SIGLAS

PA – Pará

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

OPU – Aspiração Folicular – *Ovum Pick-Up*

PIVE – Produção de Embriões *in vitro*

TETF – Transferência de Embriões em Tempo Fixo

ECC – Escore Condição Corporal

IVB – *In Vitro* Brasil

TE – Transferência de Embrião

PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato

CCO – Complexos Cumulus Oócitos

DGP – Diagnóstico Gestacional Precoce

DGD – Diagnóstico Gestacional Definitivo

PIB – Produto Interno Bruto

SOV – Superovulação

MOTE – Múltipla Ovulação e Transferência de Embrião

MIV – Maturação *in vitro*

FIV – Fertilização *in vitro*

ICSI – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide

CIV – Cultivo *in vitro* de Embriões

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

LH – Hormônio Luteinizante

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. DESCRIÇÃO DO LOCAL E PERÍODO DO ESTÁGIO.....	10
3. INSTALAÇÕES.....	11
4. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESTÁGIO.....	15
4.1. AVALIAÇÃO DAS RECEPTORAS.....	15
4.2. SINCRONIZAÇÃO DAS RECEPTORAS.....	16
4.4. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM TEMPO FIXO (TETF) - INOVULAÇÃO.....	20
4.5. DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO.....	21
5. REVISÃO DE LITERATURA.....	23
5.1. SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE VACAS RECEPTORAS E DOADORAS.....	25
5.2. ASPIRAÇÃO FOLICULAR.....	27
5.3. MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> - MIV.....	30
5.4. FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> – FIV.....	32
5.5. CULTIVO DOS EMBRIÕES <i>IN VITRO</i> – CIV.....	34
5.6. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO – TE.....	35
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, o rebanho brasileiro atingiu, em 2021, o número aproximado de 224,6 milhões de cabeças. Este levantamento demonstrou o crescimento pelo terceiro ano seguido e chegando a um número mais alto de todos os tempos de registro. Pelo que consta no ranking municipal de 2020, a cidade de São Félix do Xingú – PA, possui o maior número de bovinos no Brasil, com aproximadamente 2,5 milhões de cabeças (IBGE, 2021).

Para o desenvolvimento da pecuária de corte, o conhecimento das diversas áreas de produção é exigido, desde partes teóricas as partes práticas. Afim de desenvolver as partes práticas baseado nas partes teóricas que foram desenvolvidas durante a graduação, veio à vontade e oportunidade de realizar estágio na empresa Pecplan ABS, na unidade de Xinguará – PA.

As biotecnologias aplicadas a reprodução bovina vêm fornecendo ferramentas inovadoras para o desenvolvimento do trabalho de melhoramento genético da espécie. Dessa forma, a otimização de ferramentas reprodutivas demanda conhecimento, estudo e dedicação para realização de trabalhos envolvendo procedimento de Aspiração folicular/ *Ovum Pick-Up* (OPU), Produção de Embriões *In Vitro* (PIVE), Transferência de Embriões em Tempo Fixo (TETF). Por trás de todo sucesso dessas práticas existem a elaboração de um planejamento de estação de monta das propriedades atendidas, determinando datas a serem realizados os serviços. A elaboração do planejamento exige conhecimento de todo rebanho, envolvendo manejo sanitário, nutricional e ambiental e também exige o alinhamento com os clientes e seus colaboradores, para que as atividades sejam realizadas da forma mais produtiva, eficaz e segura para todos os envolvidos.

Este trabalho de relatório de estágio supervisionado possui como objetivo descrever atividades realizadas, bem como explicar sobre protocolos de sincronização da ovulação e avaliações de receptoras e doadoras, aspiração folicular, transferência de embriões e diagnósticos de gestação realizados nas propriedades atendidas pela empresa.

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL E PERÍODO DO ESTÁGIO

A unidade da empresa Pecplan ABS onde foi realizado o estágio está localizada na cidade de Xinguará, região sul do estado do Pará, na Avenida Xingu, nº 268, bairro Centro, CEP 68555-011.

Na unidade de Xinguara – PA, são elaboradas atividades de incremento no progresso genético para propriedades rurais, a saber: diagnóstico de gestação, aspiração folicular, transferência de embriões e produção *in vitro* de embriões.

A empresa ABS Global, pertence ao grupo GENUS que é uma empresa reconhecida mundialmente pelo trabalho realizado no desenvolvimento da genética bovina, fundada nos Estados Unidos da América em 1941 e presente, atualmente, em mais de 71 países. Através do trabalho realizado pela empresa, cerca de 17 milhões de doses de sêmen são comercializadas por ano, ao redor de todo o mundo, produzindo aproximadamente 450.231 embriões somente no Brasil. Através do trabalho desenvolvido no avanço e melhoramento genético, a ABS consegue fornecer melhorias tanto ao gado de leite quanto ao de corte.

No ano de 2018 ocorreu a junção com o laboratório especializado em fertilização, *In Vitro* Brasil (IVB), somando ainda mais conhecimento e profissionalismo a linha de desenvolvimento da empresa, sendo a estrutura presente na unidade de Xinguara oriunda das bases da IVB.

O estágio ocorreu a campo, acompanhando as equipes de médicos veterinários no desenvolvimento de suas atividades. Foram acompanhados ao longo do período de estágio procedimentos de protocolos hormonais para sincronização de ovulação, diagnósticos ginecológicos, aspirações foliculares, transferências de embriões, diagnósticos de prenhez com 30, 60, 180 dias, e sexagem fetal. Assim como, avaliação de lotes de doadoras e também de receptoras.

O estágio supervisionado ocorreu no período de 31 de outubro de 2022 a 27 de fevereiro de 2023. Sob supervisão do Médico Veterinário Layson Silva de Souza que ocupa o cargo de Supervisor Técnico de Campo da unidade de Xinguara -PA. Ao longo do estágio foram realizados atendimentos em diversas propriedades, acumulando um total aproximado de 10.000 (dez mil) animais manejados, dentre estes, doadoras submetidas a aspirações e receptoras (de variadas categorias) submetidas a transferências de embriões.

3. INSTALAÇÕES

A unidade possui estrutura física composta por recepção conjunta com a sala de administração, almoxarifado, local de armazenamento de todos materiais de uso do laboratório e a campo, Sala de armazenamento de botijões e ao fundo laboratório de produção *in vitro*.

Figura 1 – Fachada do escritório ABS unidade Xingura – PA



FONTE: Fotografada pelo autor (2023).

Figura 2 – Recepção do laboratório e sala de administração



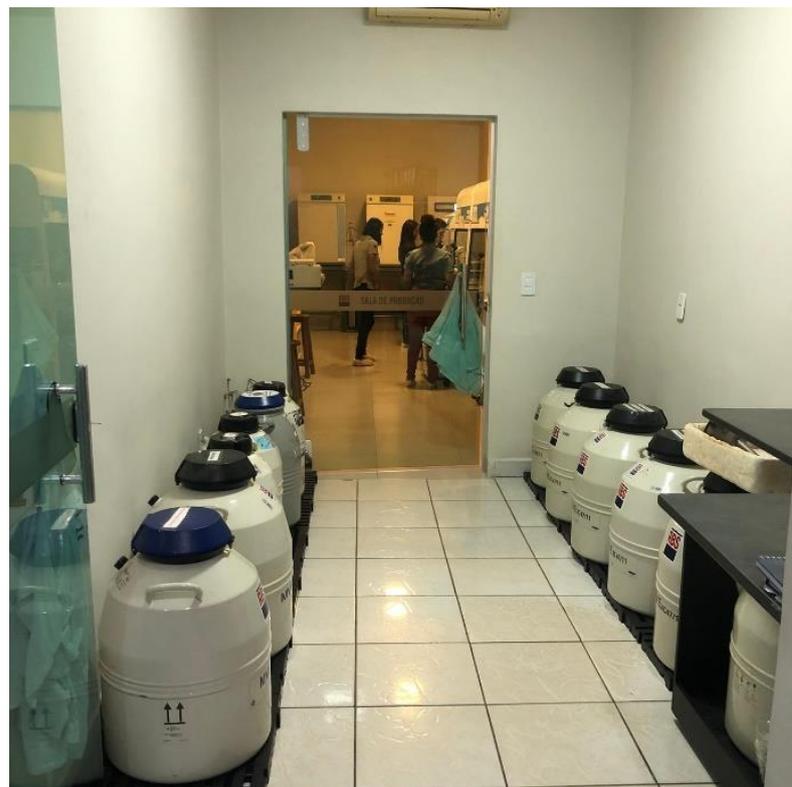
FONTE: Fotografada pelo autor (2023).

Figura 3 – Almojarifado de materiais utilizados no laboratório e campo



FONTE: Fotografada pelo autor (2023).

Figura 4 – Sala de armazenamento de botijões e ao fundo laboratório para produção *in vitro*



FONTE: Fotografada pelo autor (2023).

Durante período de estágio o corpo de colaboradores da ABS na unidade de Xinguara era composto por sete médicos veterinários, duas biomédicas, duas secretárias e dois técnicos de laboratório. Os médicos veterinários possuem diferentes funções, dentre as de supervisores de campo de TE e OPU, gerente de negócios e embriões, equipes de OPU e equipes de TE. E

possui uma equipe de laboratório, responsável por todo processo de produção dos embriões *in vitro* (PIVE).

As propriedades atendidas se encontram localizadas nos estados do Pará, Tocantins e Maranhão.

Figura 5 – Fazenda localizada no Sul do estado do Pará



FONTE: Fotografada pelo autor (2023).

Figura 6 – Equipe de transferência de embriões em fazenda localizada no distrito de Três Poderes – Marabá / PA



FONTE: Fotografada pelo autor (2023).

4. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESTÁGIO

O estágio realizado na empresa ABS Pecplan unidade de Xinguara ocorreu no período de 31 de outubro 2022 a 27 de fevereiro 2023, totalizando 688 horas.

O escritório da unidade de Xinguara presta atendimento de segunda a sexta-feira das 8:00 às 18:00 horas, e aos sábados das 08:00 às 12:00 horas. Toda logística de serviços era alinhada pela equipe juntamente com os clientes, para que houvesse o melhor alinhamento possível.

No campo, os trabalhos tinham início entre 7:00 e 8:00 horas da manhã e seguiam conforme serviço e número de animais manejados. Todos serviços realizados contavam com a supervisão do médico veterinário Layson Souza.

A divisão das equipes era feita de acordo com os serviços agendados para cada semana, sendo todas elas constituídas de pelo menos um médico veterinário. Para os procedimentos de aspiração folicular a equipe era constituída por um médico veterinário, um selecionador e um estagiário (a), para serviços que demandavam presença do laboratório a campo a equipe era formada pelo médico veterinário, selecionador e dois laboratoristas para envase dos embriões.

As atividades realizadas durante o período de estágio englobaram avaliação de receptoras (avaliação ginecológica, manejo sanitário, nutricional e reprodutivo dos animais), protocolos hormonais para sincronização da ovulação das receptoras, aspiração folicular (*Ovum Pick-Up*), Transferência de Embriões em Tempo Fixo (TETF), diagnósticos gestacionais precoces e definitivos, sexagem fetal.

4.1. AVALIAÇÃO DAS RECEPTORAS

A avaliação das fêmeas bovinas direcionadas a recepção dos embriões é indispensável para o manejo reprodutivo, sendo avaliados a anatomia e *status* do trato reprodutivo dos animais. Este exame influencia diretamente na eficiência produtiva, amenizando perdas econômicas e garantindo aspectos qualitativos.

De acordo com os animais disponíveis para serviço na propriedade, os lotes eram encaminhados ao curral e no tronco de contenção o médico veterinário realizava exame visual, avaliando Escore Condição Corporal (ECC), inspeção de possíveis lesões ou desconformidades anatômicas. A anamnese do lote sempre deve ser realizada, buscando informações sobre protocolos sanitários, reprodutivos e nutrição das receptoras.

O exame ginecológico era realizado na fêmea contida de formada adequada, por meio da palpação retal, avaliava-se conformação anatômica do trato reprodutivo. Como exame complementar, a ultrassonografia garantia a avaliação detalhada do útero e ovários. Eram avaliados aspectos anatômicos de vulva, cérvix, corpo do útero, cornos uterinos e ovários.

O registro em planilhas com informações dos exames das fêmeas era de responsabilidade dos estagiários. Todas informações recolhidas eram utilizadas ao longo de todo processo, desde aspiração à TETF.

Figura 7 – Avaliação ginecológica de receptoras destinadas a TETF



FONTE: Fotografada pelo autor (2023).

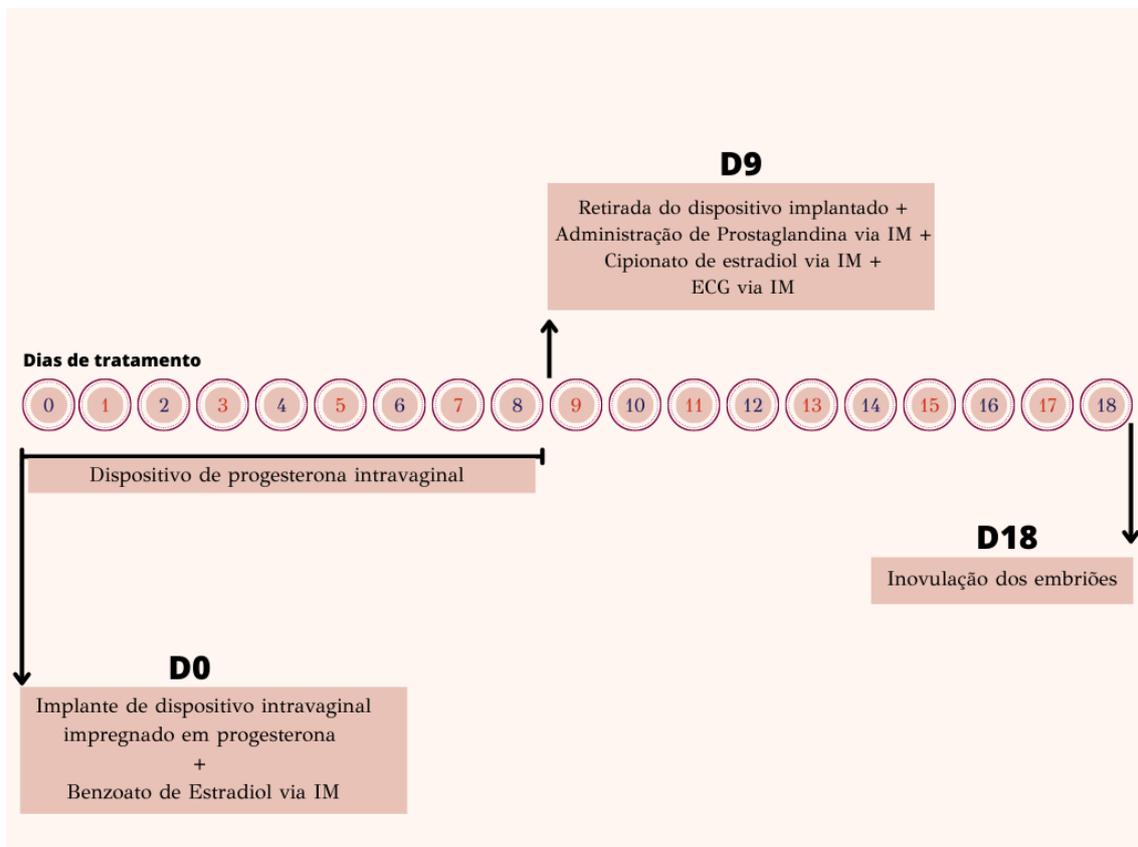
4.2. SINCRONIZAÇÃO DAS RECEPTORAS

A sincronização das receptoras consiste na manipulação do ciclo estral através de protocolos hormonais. A aquisição dos protocolos ficava sob responsabilidade das propriedades, utilizando laboratórios de suas preferências.

Assim, os protocolos apresentavam alterações de acordo com orientações dos laboratórios para seus respectivos hormônios, porém, no que diz respeito aos princípios ativos, estes se mantinham os mesmos em todos protocolos. Desta forma, as equipes destinadas aos manejos de protocolo apenas ajustavam as doses de acordo com a concentração orientada por cada laboratório e realizavam os protocolos de sincronização utilizados pela ABS Xinguará. (Figura 8).

Para a execução dos protocolos de sincronização da ovulação das receptoras, ficavam sob responsabilidade dos estagiários a organização e montagem de todo equipamento. Em alguns manejos, sob supervisão dos médicos veterinários da equipe de campo, os ajustes de dose e administração dos fármacos nas receptoras eram designados aos estagiários.

Figura 8 – Fluxograma do protocolo de sincronização da ovulação em receptoras de 3 manejos com descrição dos dias de tratamento e fármacos a serem utilizados



FONTE: ABS Xinguara (2023).

4.3. ASPIRAÇÃO FOLICULAR (*OVUM PICK-UP*)

A técnica de recuperação de oócitos em fêmeas bovinas vivas, guiada por aparelho ultrassonográfico via transvaginal, reconhecida também por “*Ovum Pick-Up*” (OPU), é amplamente realizada em bovinos (MESQUITA, 2015).

Primeiramente, encaminha-se as fêmeas bovinas doadoras de oócitos ao tronco de contenção, garantindo o bem estar, evitando-se o máximo possível de estresse. Após a correta contenção, aparelhos devidamente organizados e operantes, o médico veterinário responsável, realizava palpação retal para exame dos ovários, seguindo de lavagem da região perianal com

água. Posteriormente, era realizado o bloqueio epidural baixo com lidocaína a 2,0%, na dose de 1ml/100kg PV (mas sempre se atentando as particularidades das diferentes raças).

O procedimento de aspiração folicular guiado por ultrassom foi realizado utilizando aparelhos das marcas Sonoscape®, modelo EV2, e Mindray®, modelo DP50. Ambos possuíam transdutor micro convexo acoplado a uma guia de aspiração folicular da marca WTA®. Juntamente acoplada ao transdutor, há um mandril móvel com agulha descartável acoplada a sua extremidade. Para o sistema a vácuo as equipes utilizavam duas bombas, uma bomba de aspiração da marca TED®, modelo Touch BA – 06 TRF e outra da marca WTA®, modelo BV – 003D. A pressão da bomba era ajustada entre 60 e 80 mmHg. O sistema de vácuo é interligado entre bomba e mandril por um sistema de silicone vedado. O ultrassom é indispensável para esta técnica, uma vez que, através de sua imagem, visualizamos e localizamos os folículos a serem aspirados, sendo o guia do aspirador durante toda a técnica.

Figura 9 – A) Equipamento de ultrassonografia para realização do procedimento de aspiração folicular. B) Aspiração folicular guiado por ultrassom. C) Seleccionador realizando seleção dos oócitos aspirados no procedimento em laboratório a campo. D) Oócitos

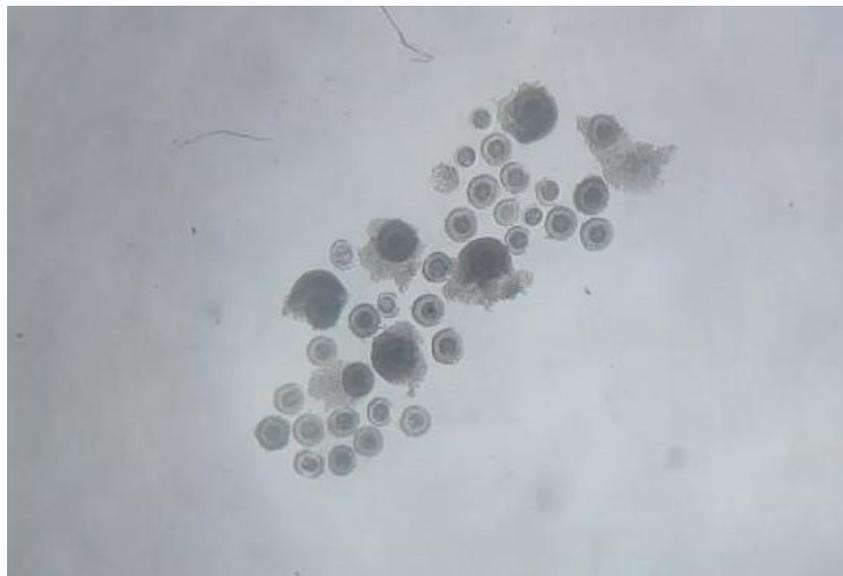


FONTE: Fotografada pelo autor (2023).

Durante a varredura ovariana, através da imagem do ultrassom, o médico veterinário posicionava a guia e através da aspiração pela agulha penetrava os folículos, puncionando os oócitos para um tubo Falcon de 50ml, contendo 5ml de Solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Os complexos cumulus oócitos (CCO) contidos no tubo Falcon, eram posteriormente encaminhados ao laboratório de campo, onde o selecionador realizava a filtragem e lavado do conteúdo com solução PBS e depositava-os em placa Petri, colocada sob lupa, a seleção era realizada e classificados por seus graus, de acordo com a avaliação das camadas de células no complexo cúmulo oócitos.

Figura 10 – Oócitos selecionados a campo



FONTE: Fotografada pelo autor (2023).

Após etapa de seleção realizada, os oócitos são armazenados em criotubos contendo meio de maturação, isolados e são transportados em transportadora portátil eletrônica, garantindo temperatura estável até chegada ao laboratório.

A OPU é a primeira etapa na produção de embriões *in vitro* – PIVE – e este processo envolve em ordem cronológica: maturação oocitária *in vitro*, fertilização *in vitro* e cultivo *in vitro*. Todos realizados em laboratório, por profissionais destinados a cada função. O processo termina com o envase dos embriões após sete dias, e seguinte transferência em receptoras (caso for embriões a fresco).

As etapas da PIVE relacionadas ao laboratório da unidade ABS Xinguara não foram acompanhadas, pois não faziam parte do quadro de atividades propostas a serem realizadas, uma vez que o estágio curricular era voltado para as atividades a campo.

4.4. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM TEMPO FIXO (TETF) - INOVULAÇÃO

A inovulação consiste na técnica de depositar o embrião no terço médio final do corno uterino ipsilateral ao ovário que apresenta corpo lúteo (CL) e é realizada no D18. No dia da transferência o médico veterinário realiza avaliação da receptora por exame de palpação transretal, para identificação da presença do CL e assim confirmara que o animal respondeu ao protocolo hormonal aplicado. Todo procedimento precede com a aplicação de bloqueio epidural baixo, utilizando lidocaína 2%, na dose de 1ml/100kg PV (podendo variar de acordo com raça).

O envase dos embriões ocorre em palhetas francesas finas de 0,25ml com meio H -SOF, lacrados e colocados em uma transportadora específica para embriões (TE 200i WTA) na temperatura constante de 37,1°C. Os embriões são identificados e relacionados de acordo com os acasalamentos, e através de um inovulador TE 0,25 WTA, realiza-se a transferência. Para diminuir os riscos de contaminação utiliza-se camisinha sanitária no momento da inovulação.

Figura 11 – A) Mesa montada a campo com material utilizado na TE: transportadora, inovuladores, bainhas, camisinha sanitária, anestésico, luvas de palpação



FONTE: Fotografada pelo autor (2023).

Figura 12 – Transportadora contendo palhetas envasadas com embriões



FONTE: Fotografada pelo autor (2023).

A unidade ABS Xinguara realiza em seu laboratório o armazenamento de embriões em três formas: embriões a fresco, embriões vitrificados e DT (*Direct Transfer*).

4.5. DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

O diagnóstico de gestação é de suma importância no manejo reprodutivo das receptoras, através deste diagnóstico pode-se encerrar os trabalhos e realizar o relatório das transferências. Com 23 dias após a transferência pode-se realizar o DGP – Diagnóstico gestacional precoce. Por meio do uso de ultrassom detecta-se a presença de prenhez na receptora. Entre o 56º ao 70º dia da gestação realiza-se o DGD – Diagnóstico gestacional definitivo, e eventualmente a sexagem fetal, caso fosse opção do cliente.

Figura 13 – Procedimento de diagnóstico de gestação sendo realizado por meio da palpação transretal guiada por aparelho de ultrassonografia (US)



FONTE: Fotografada pelo autor (2023).

De acordo com as atividades mencionadas durante o período de estágio, segue abaixo a tabela de casuísticas.

Tabela 1 – Casuísticas

ATIVIDADE	ACOMPANHAMENTO	EXECUÇÃO
DG/ EXAME GINECOLÓGICO (D0 + DGP + DGD)	3728	520
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES	2634	-
OPU	493	14
TOTAL	6855	534

FONTE: Elaborada pelo autor (2023).

5. REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil é um país muito dependente de sua pecuária, sendo esse, um dos principais pilares do Produto Interno Bruto – PIB do país, por ter um papel tão fundamental para a economia do país, a pecuária brasileira se encontra em constante desenvolvimento e renovação. Dados do IBGE de 2019 mostram que houve uma produção bruta de 223 bilhões de reais relacionados à um rebanho bovino que tinham mais de 214 milhões de reais (IBGE, 2019)

Essa mesma produção durante o ano de 2020, teve seu valor bruto de produção aumentado cerca de 6%, o que aconteceu em razão do surgimento da pandemia do COVID-19 que atingiu um montante de 236 bilhões de reais (MAPA; 2020). Esse aumento da produção continuou também durante o ano de 2021, principalmente durante o primeiro trimestre do ano, aumentando 1,2% em comparação com os três últimos meses do ano de 2020 (CNA, 2021).

A análise desses números e o aumento dessas produções nos últimos anos, permite identificar a importância que os rebanhos bovinos possuem para a economia brasileira e seu crescimento. O aumento da produção de rebanhos bovinos só é possível em razão do desenvolvimento de biotecnologia voltada para a reprodução, o que permite também identificar a importância de trabalhos e pesquisas nessa área, que vão propiciar o melhoramento da reprodução de rebanhos bovinos e, conseqüentemente, apoiar o desenvolvimento da economia brasileira.

Apesar de grande importância para o desenvolvimento da economia brasileira, de acordo com Viana, Figueiredo e Siqueira (2017) as tecnologias necessárias para o avanço da reprodução bovina, foram se desenvolvendo aos poucos no país, quando comparadas com o restante do mundo. Esse atraso no desenvolvimento dessas tecnologias, tornou necessário compreender mais profundamente como se deu cada fase do progresso científico, para assim entender como o país superou esse atraso e passou a ocupar o lugar de destaque mundial no setor de produção de bovinos.

Um dos fatores que apoiou o desenvolvimento no setor de produção de bovinos no Brasil foi a implantação da técnica de produção *in vitro* de embriões – PIVE., Viana, Figueiredo e Siqueira (2017) afirmam que atualmente essa técnica é a mais procurada quando trata-se desse tema, e seu progresso passou por um longo período de evolução que teve início na década de 1990, quando ainda não existia a técnica de produção *in vitro* e o Brasil era responsável por somente 6,6% da produção mundial de embriões bovinos. Com o início da implantação da produção *in vitro* no país, esse número passou para 8,1% na década de 2000 e para 48% da produção mundial de embriões bovinos na década de 2010, tendo um aumento muito significativo (GONÇALVES; VIANA, 2019).

Anteriormente a implantação da PIVE, o setor de produção de bovinos utilizava uma série de outros métodos, como: a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a formação de bancos de sêmen, a superovulação (SOV), a transferência de embrião (TE), a múltipla ovulação e transferência de embrião (MOTE). Todos esses métodos foram essenciais para o avanço científico dessa área, e de acordo com (RUMPF, 2007) são possibilidades que ainda estão disponíveis nos programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos. Além disso, esses métodos também foram fundamentais no desenvolvimento da PIVE, que marca a mudança para a utilização de ferramentas mais modernas, utilizando a vitrificação e congelamento de embriões, a clonagem e a modificação de material genético (transgenia).

A técnica de produção *in vitro* foi aos poucos se tornando a mais aplicada na produção de bovinos, e em 2017 observou-se pela primeira vez um maior número de embriões produzidos através da técnica *in vitro* do que da técnica *in vivo*. Nesse sentido, no ano de 2017 consolidou-se a utilização da técnica *in vitro* para a produção de embriões bovinos no Brasil. A partir desses dados, o Brasil passou a ser responsável por 34,8% da produção mundial de embriões, utilizando tanto da técnica *in vitro* como da técnica *in vivo*, assim o país se tornou o segundo maior produtor do mundo, em primeiro lugar estão os Estados Unidos, responsável por 45,3% da produção mundial (GONÇALVES; VIANA, 2019).

Quando foi iniciada a utilização da técnica PIVE no Brasil, foi possível observar a predominância da sua aplicação nas raças zebuínas de corte, o que fez surgir o entendimento de que essa técnica só poderia ser aplicada nessas raças especificamente. Nesse sentido, inicialmente foi considerado que a PIVE só teve sucesso comercial no país em razão desse fato isolado, não podendo ser relacionado com o mercado mundial de embriões. De acordo com Viana e Figueiredo (2016), com a contínua aplicação da PIVE no país, essa perspectiva deixou de ser realidade, e o Brasil aproximou-se do perfil de produção *in vitro* no mercado internacional. Outros autores, como Pereira et al. (2017) também enfatizam essa afirmação, garantindo que não há diferença entre as raças guzerá zebuína e holandesa taurina quando se trata da recuperação de oócitos.

Em contra partida, também existem outros autores que afirmam existir uma predominância maior de oócitos em raças zebuínas em comparação às taurinas. Segundo Pinho (2019) e Cruvinel (2019), esses autores afirmam que existe um aumento expressivo na quantidade e na qualidade de oócitos de vacas originadas do cruzamento de *B. Taurus* e *B. Indicus*. Buscando entender esses resultados mais profundamente, Guimarães et al. (2020) em seu trabalho, analisaram o sucesso de gestações que foram desenvolvidas por PIVE em ambas as raças, zebuínas e taurinas. Em seus resultados, analisando as taxas de coleta e de qualidade

de oócitos e a conversão para embrião e implantação desses embriões, os autores identificaram que não existiu diferença significativa no sucesso das gestações entre as raças.

Com a implantação da técnica da PIVE, diversas vantagens passaram a ser observadas nos programas de reprodução de bovinos. Entre essas vantagens, Rumpf (2007) cita: o aumento do potencial de multiplicação de animais com alto valor genético e zootécnico; o aprimoramento das técnicas de maturação *in vitro* (MIV); a fertilização *in vitro* (FIV); a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI); a utilização de bezerras pré-púberes, de vacas em início de gestação, vacas com subfertilidade adquiridas e vacas senis; e otimização no uso de doses de sêmen sexado.

Esta revisão de literatura objetiva tratar das etapas de produção *in vitro* de embriões, para isso, ela foi dividida em seis seções além da presente introdução, sendo elas: seleção e avaliação de vacas receptoras e doadoras; aspiração folicular ou colheita de oócitos; maturação *in vitro* dos oócitos; fertilização *in vitro*; cultivo *in vitro* dos embriões (CIV); e transferência dos embriões para as vacas receptoras. Cada uma dessas seções pode ser observada abaixo, tratando primeiro da seleção e avaliação de vacas receptoras e doadoras.

5.1. SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DE VACAS RECEPTORAS E DOADORAS

Como observado na seção acima, a utilização da técnica de reprodução *in vitro* se tornou um grande apoio para a reprodução de bovinos no país, permitindo o aumento da produção e colocando o Brasil como país essencial para o cenário mundial de produção de bovinos. De acordo com Becher et al. (2018), esse sucesso esteve relacionado a diversos fatores, como: a escolha da raça a ser utilizada como doadora dos gametas femininos e masculinos; a nutrição e escore corporal das doadoras de oócitos; o estado reprodutivo e a idade da doadora; a concentração plasmática do hormônio anti-mulleriano como indicador de qualidade e quantidade dos oócitos a serem coletados; o fornecimento de sais minerais integrado à dieta dos animais, principalmente o selênio que está diretamente relacionado à qualidade dos oócitos; a detecção de folículos dominantes ou de corpo lúteo que podem interferir na qualidade dos oócitos; e a inclusão de fêmeas pré-púberes em programas de PIVE como forma de reduzir o intervalo entre gerações e acelerar o melhoramento genético.

Honorato et al. (2013) consideram como aspectos essenciais na PIVE: doadoras quanto receptoras devem estar integradas a um manejo nutricional de qualidade, como o fornecimento de sal mineral, além do manejo sanitário, por exemplo; a administração de vacinas contra IBR, BVD e leptospirose, que refletem na diminuição das perdas por aborto ou absorção embrionária;

e o bem-estar do animal, verificando se a vaca entra e sai do brete de contenção correndo e agitada, ou caminhando e calma, o que também tem impacto nas taxas de concepção.

Ao mesmo tempo, também existem autores na literatura, que citam as variáveis e fatores que não precisam ser levados em consideração durante esse processo. Dantas et al. (2018), em seu trabalho, trazem algumas dessas variáveis, citando inicialmente, que as vacas receptoras precisam passar por no mínimo quatro avaliações no processo de PIVE, tendo cada uma dessas avaliações um objetivo específico. A primeira avaliação é realizada para que seja possível realizar a seleção do animal que fará parte do processo; a segunda determina o nível de resposta da fêmea selecionada após a primeira etapa e após a realização do protocolo hormonal; já a terceira etapa é responsável por diagnosticar a gestação; e a última etapa identifica quais gestações realmente chegaram ao parto.

Durante a avaliação dessas quatro etapas, Dantas et al. (2018), observaram que nas matrizes que não possuíam a presença de corpo lúteo no exame ginecológico preliminar que acontecia anteriormente ao protocolo hormonal, continham taxas de concepção iguais aquelas em que haviam corpo lúteo no mesmo momento. Porém, os autores também afirmam que a presença ou não do corpo lúteo no momento em que ocorre a avaliação preliminar não pode ser tratado como determinante. Em razão disso, torna-se possível aumentar a quantidade de receptoras destinadas à biotécnica o que, conseqüentemente, torna possível diluir os custos fixos associados à realização do programa.

Outros autores que também discutem o processo de produção de embriões bovinos através da técnica *in vitro* (Andrade et al., 2012), argumentam que o sucesso de um programa de transferência de embrião, só é alcançado quando existe a minuciosa sincronia entre a receptora e o embrião. A partir desse entendimento, os autores enfatizam a necessidade de se fazer escolhas precisas durante a seleção do embrião, garantindo que o mesmo esteja na fase ideal para coincidir com o ambiente uterino da receptora que está sendo submetida ao protocolo hormonal (ANDRADE et al., 2012).

Jelonschek et al. (2018), também tratam sobre o tema, relatando que a quantidade de vezes que o animal foi utilizado previamente em programas de transferência de embriões, pode influenciar diretamente no sucesso dessas tentativas. Além disso, os autores também apontam a relação inversa que existe entre a eficiência reprodutiva das receptoras e o número de transferência de embriões prévias. Nesse sentido, quanto mais vezes uma determinada receptora for submetida ao procedimento, mais ela perderá eficiência reprodutiva, sendo necessário que as vacas que possuem quatro ou mais transferência de embriões deixem de ser submetidas ao procedimento. Outro fator que, de acordo com os autores, pode impactar no sucesso da

transferência de embriões é a eventual má higienização do animal, que pode levar à contaminação do útero e afetar diretamente o sucesso do procedimento.

5.2. ASPIRAÇÃO FOLICULAR

Com as atualizações tecnológicas que foram surgindo no processo de reprodução bovina, algumas técnicas deixaram de ser aplicadas. Esse foi um processo que aconteceu, principalmente, na obtenção de oócitos *in vivo*. Anteriormente essa obtenção ocorria a partir da realização de laparotomia, uma técnica complexa e sujeita a complicações, que pode levar até mesmo a aderências ovarianas. Essa técnica deixou de ser aplicada, e passou a utilizar a técnica mais moderna, que é mais simples, pouca invasiva, de rápida duração e com custos mais inferiores, chamada aspiração folicular e reconhecida pela sigla em inglês OPU – *ovum pick up*, que na tradução literal significa “pegar o ovo” (LUEDKE et al., 2019).

A obtenção de oócitos é um dos principais processos dentro da reprodução de bovinos, já que é o processo que realmente garante essa reprodução. Em razão de sua importância, são muitos os trabalhos na literatura dedicados a compreender mais profundamente as etapas desse processo, que são, a maturação, a fertilização, a clivagem inicial e o cultivo *in vitro* de embriões. Para realizar essas pesquisas, muitos autores, através de matadouros, obtiveram vários ovários de vacas *post mortem*, para que assim pudessem coletar o maior número possível de amostras de oócitos de maneira mais fácil e rápida, e a partir dessas amostras estudar como ocorre esse processo (GOTTARDI; MINGOTI, 2009; CROCOMO et al., 2011; CROCOMO et al., 2013).

O processo de coletar os ovários em matadouros podem ser realizados a partir de duas principais técnicas, que também podem ser aplicadas para recolher ovários em animais que vieram a óbito por causas naturais, mas que possuem um alto valor genético. A primeira dessas técnicas chama-se *slicing* e é realizada em dois momentos, no primeiro é feito o fatiamento da porção mais externa do ovário, e no segundo momento é feita a coleta do líquido folicular. Já a segunda técnica é feita a partir de uma aspiração mais precisa dos folículos. Santos et al. (2016), em seu trabalho, realizou um experimento a partir do qual comparou as duas técnicas, como resultado, ele concluiu que a taxa de recuperação de oócitos quando realiza-se a técnica de *slicing* é maior do que aquela obtida ao utilizar a técnica de aspiração. Porém, em sua análise, Santos et al. (2016), também observou que os oócitos coletados através da técnica de aspiração possuem uma maior qualidade do que aqueles que foram coletados pela técnica de *slicing*, e como a qualidade dos oócitos é um dos critérios mais fundamentais para o desenvolvimento dos embriões, entende-se que a melhor técnica a ser aplicada é a de aspiração.

Para compreender como ocorre a realização da técnica de aspiração folicular é preciso entender o processo de preparação que acontece anteriormente a coleta. Quando a técnica é realizada para a coleta de oócitos *in vivo*, Gouveia (2011), afirma que é preciso executar a higienização na vulva da vaca doadora com água e sabão neutro, após a higienização é preciso fazer a secagem do local, de forma a evitar qualquer contaminação ascendente no sistema produtivo. Renesto (2004), e Gimenes (2010), também estudam a realização da técnica de aspiração folicular, e afirmam que nesse processo também é importante realizar a anestesia epidural no animal, aplicando-a entre a articulação sacro caudal ou entre a primeira e segunda vértebra coccígeas, utilizando para isso lidocaína 2% sem vaso dilatador com dosagem de 1ml por 100 quilogramas de peso vivo. Os autores afirmam que esse procedimento é de grande importância para impedir a realização de movimentos peristálticos que podem dificultar a manipulação do ovário através do reto, além disso, esse processo pode evitar também traumas ao animal.

Após feita a higienização da vulva da vaca doadora e a realização da anestesia epidural no animal, é realmente iniciada a aspiração folicular, para isso, é colocado no fundo do saco vaginal do animal, uma guia acoplada ao transdutor. Esse é um processo que passou por mudanças com o passar dos anos e o desenvolvimento da tecnologia nessa área. Anteriormente, o comum era utilizar o transdutor linear, mas com o desenvolvimento da técnica, passou a utilizar o transdutor microconvexo ou setorial, o que de acordo com Seneda et al. (2004), aumentou em cerca de 10% a 20% no total de oócitos coletados.

A aspiração folicular, é realizada através de uma bomba de vácuo que é ligada a um tubo falcon no qual contém 5ml de PBS mais 5,0 UI/ml de heparina. De acordo com Cruz et al. (2009), a utilização dessas soluções é o que vai impedir a coagulação do sangue advindo da microcirculação do fundo de saco da vagina ou até mesmo do próprio ovário e, por isso, deve permanecer aquecida à uma temperatura de 38°C. Dayan (2001) enfatiza que acoplado ao tubo falcon, é preciso também existir uma linha de aspiração por meio de uma rolha, que tem como objetivo percorrer o interior do mandril da guia intravaginal e fazer a ligação com a agulha que punciona os folículos. O vácuo que é gerado a partir da punção nos folículos, permite que o líquido se desloque para dentro do tubo, carregando assim, os oócitos de interesse.

Apesar de muito importante para o processo de reprodução de bovino, a realização da aspiração folicular não é um procedimento barato para as fazendas que a realizam. Nesse sentido, Seneda et al. (2004) desenvolveu em seu trabalho um comparativo entre as bombas de vácuo utilizadas na aspiração folicular, com o objetivo de buscar maneiras de diminuir os custos gastos com materiais. Como resultado, os autores identificaram que utilizar uma bomba a

infusão ao invés de uma bomba de vácuo seria uma alternativa viável e eficiente que possibilitaria uma diminuição dos custos.

Porém, outros autores que também discutem essa mudança de bombas como forma de diminuir custos, enfatizam a necessidade de ajustar cuidadosamente a pressão da bomba a vácuo, de forma que as estruturas dos oócitos coletados não sejam comprometidas e, principalmente, que as células *cumulus oophorus* sejam preservadas, já que são essenciais para o desenvolvimento do processo de fertilização (VIANA; BOLS, 2005).

Por existirem diversas possibilidades de bombas que podem ser aplicadas no processo de aspiração folicular, conseqüentemente, o uso de cada bomba trará resultados diferentes para esse processo. Nesse sentido, muitos autores identificaram como a pressão pode variar entre determinadas faixas, dependendo da bomba que está sendo utilizada. O uso de cada bomba e a pressão gerada pela mesma, pode ser observado na tabela 2 abaixo, relacionadas também com o autor que estuda cada uma dessas bombas.

Tabela 2 – Faixa de pressão por bomba utilizada

FAIXA POR PRESSÃO	AUTOR
De 72 a 78 mmHg ou vazão de 15 ml/minuto	RENESTO, 2004; GOUVEIA, 2011; DAYAN, 2001
86 mmHg ou vazão de 16 a 19 ml/minuto	GIMENES, 2010
Vazão de 10 ml/minuto	CRUZ <i>et al.</i> , 2009
60 a 100 mmHg ou vazão de 10 a 20 ml/minuto	EMBRAPA, 2014

FONTE: Elaborada pelo autor baseado em RENESTO, 2004; GOUVEIA, 2011; DAYAN, 2001; GIMENES, 2010; CRUZ *et al.*, 2009; EMBRAPA, 2014.

Cada vez mais, observa-se a utilização da aspiração folicular realizada *in vivo*, sendo essa técnica, muito difundida ao redor do mundo. Existem vários aspectos que permitem essa técnica ser tão utilizada, entre eles está a possibilidade de aplicação da técnica também em animais que adquiriram algumas patologias, e não somente naqueles animais que estão 100% saudáveis.

Na realização de TE e de inseminação artificial em tempo fixo – IATF alguns animais que possuem aderências de tuba e útero, mucometra e gestação em curso, não podem participar dessas técnicas, em razão de possuir essas patologias ou condições. Porém, quando se trata da aspiração folicular – OPU, a EMBRAPA (2014), afirma que essa técnica pode ser aplicada,

independentemente do animal possuir alguma das condições citadas acima, sendo necessário, somente que os ovários estejam ativos e que possam ser manipulados.

A partir do início dos anos 2000, a aspiração folicular passou por uma série de avanços que permitiu o aprimoramento e a otimização da técnica, principalmente em relação à coleta de oócitos de qualidade superior. Por ter se tornado uma técnica tão essencial no processo de reprodução bovino, diversos autores passaram a estudar o tema e a definir os aspectos que podem influenciar no sucesso ou não da aplicação da aspiração folicular. Viana e Bols (2005), indicam que o sucesso dos programas de produção de embriões *in vitro* se dá devido ao número e à qualidade dos complexos cúmulos-oócitos – CCO's advindos da aspiração folicular.

Todas essas, são possibilidades que permitem o melhor desenvolvimento de embriões e, conseqüentemente, o aumento da reprodução bovina. Essas possibilidades são consequência de uma série de pesquisas sobre o tema, que em conjunto permitiram o avanço da técnica, principalmente no Brasil, transformando o país em um exemplo mundial de reprodução de bovinos por embriões.

5.3. MATURAÇÃO *IN VITRO* - MIV

Ao fim da realização do procedimento de aspiração folicular, o conteúdo líquido que foi recuperado dos folículos e que antes se encontrava no tubo falcon, é transferido para um filtro, no qual ocorre a coleta de embriões, após esse processo, o mesmo é lavado com a mesma solução que foi utilizada durante a aspiração. De acordo com Renesto (2004), o processo de lavagem deve ocorrer até que o líquido se torne límpido, e sua realização é de grande importância, já que pode facilitar a visualização dos oócitos no microscópio.

Para que seja possível essa visualização no microscópio, o conteúdo é colocado em uma placa petri. Esse processo precisa ser realizado com muito cuidado, já que de maneira alguma pode-se perder os oócitos presos à malha do filtro. O mesmo conteúdo que foi anteriormente aplicado, deve ser novamente inserido no fundo do filtro. Para realizar esse processo, o ideal é utilizar uma seringa de 20ml, após inserido o conteúdo no fundo do filtro, o mesmo deve ser entornado mais uma vez dentro da mesma placa petri. Ao fim do procedimento, a placa deve ser levada ao microscópio para que seja possível realizar a localização, lavagem e classificação dos oócitos coletados (DAYAN, 2001).

Existem alguns critérios de classificação no qual se baseiam as características das células do complexo cumulus-oócitos. De acordo com Gouveia (2011), esses critérios levam em conta, principalmente, a morfologia e a quantidade de camadas desses oócitos, que geralmente são avaliados como: grau I, grau II, grau III, grau IV, ou desnudos. Durante os processos de

maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário, Luedke et al. (2019), identifica uma série de aspectos que possuem um papel fundamental para a realização desses processos, como a celularidade do cumulus e as junções GAP-comunicante, que se encontram entre o *cumulus* e os oócitos.

A lavagem dos oócitos é outra etapa de grande importância para o desenvolvimento do processo e, por isso, existem uma série de autores que tratam o tema e indicam as possibilidades de métodos que podem ser utilizados. Cada uma dessas possibilidades pode ser observada na tabela 3 abaixo.

Tabela 3 – Possibilidades para lavagem dos oócitos

LAVAGEM DOS OÓCITOS	AUTOR
Lavar os oócitos 3 vezes e utilizar o TCM-199 HEPES suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 70mg de amicacina.	RENESTO, 2014
Lavar os oócitos 4 vezes, nas duas primeira utilizar meio de lavagem H199, e nas duas últimas utilizar meio de maturação B199.	GIMENEZ, 2010
Utilizar TCM modificado composto por TCM-199 acrescido de bicarbonato de sódio, sulfato de gentamicina e tampão HEPES.	ANTONIOLLI, 2005
Utilizar TCM-199 suplementado com 10% de SFB.	DAYAN, 2001
Utilizar TCM-199 com sais de Hanks, tampão HEPES, antibiótico penicilina e estreptomicina e soro fetal bovino.	EMBRAPA, 2014

FONTE: Elaborada pelo autor baseado em RENESETO, 2014; GIMENEZ, 2010; ANTONIOLLI, 2005; DAYAN, 2001; EMBRAPA, 2014.

Após o fim desse processo de lavagem, é feita a transferência dos oócitos para os meios de maturação. Essa etapa tem como objetivo fornecer aos oócitos um ambiente que se assemelhe o máximo possível com o líquido folicular. Assim como diversos aspectos relacionados à reprodução bovina, o processo de maturação também é muito discutido na literatura sobre o tema, e como tal existem diversos autores que trazem diferentes meios para a realização da maturação. Entre as possibilidades, Antonioli (2005), afirma que se pode utilizar o TCM-199 acrescido de gentamicina, piruvato de sódio e bicarbonato de sódio. Já a EMBRAPA (2014), indica o TCM-199 suplementado com glutamina, antibiótico, bicarbonato de sódio, piruvato de sódio, FSH, LH, estradiol e soro fetal bovino. E Montagner et al. (2000) enfatiza que ao adicionar o tampão HEPES aos meios de lavagem e maturação, ele passa a ter

a função de minimizar a variação de pH e fornecer aos oócitos um meio que seja mais propício ao seu desenvolvimento.

Também foram realizadas pesquisas sobre a maturação *in vitro*, que tinham como objetivo buscar maneiras de diminuir os custos da produção *in vitro* de embriões. Nesse sentido, Figueiró et al. (2004), constataram que a utilização do soro de éguas em estro, é uma possibilidade que pode substituir a adição do LH e do FSH durante o processo de maturação, sem nenhuma perda. Mas, ao discutir o mesmo uso para o soro de vacas em estro, os autores já não observaram essa possibilidade.

Outra técnica que era bastante utilizada nesse processo, estava relacionada ao transporte dos oócitos, que somente eram realizados com a adoção de gases aos oócitos envasados em tubos. Porém, a partir dos resultados da pesquisa de Leivas et al. (2004), observou-se que não era necessário a realização desse processo em todos os casos, já que oócitos bovinos que se encontravam em meio de maturação TCM+HEPES em uma temperatura de 39°C e que não possuíam controle de atmosfera gasosa, poderiam ser deslocados por um período de até 12 horas, sem que suas estruturas fossem comprometidas em qualquer medida.

Observou-se nessa seção, que o processo de maturação dos oócitos compreende uma série de reações complexas, como as transformações nucleares, citoplasmáticas e moleculares. Além disso, também foi observado a interação e a regulação que ocorre de forma recíproca entre oócitos e células foliculares, que são responsáveis pela criação do ambiente necessário à capacitação dos oócitos.

Porém, outra observação que também pode ser feita, é a de que os mecanismos exatos consequências dessas reações complexas não estão completamente esclarecidos. Esse entendimento interfere na eficiência da produção *in vitro* de embriões, já que entende que o ambiente *in vitro*, na verdade pode não proporcionar as competências necessárias para que os oócitos desenvolvam um embrião viável (GOTTARDI; MINGOTI, 2009). Nesse sentido, de acordo com Luedke et al. (2019), o que pode afirmar com certeza é, para que seja possível o desenvolvimento da maturação, é necessário que os oócitos migrem do estágio de diplóteno da prófase I, que é a primeira divisão meiótica, para o estágio de metáfase II, entendida como a segunda divisão meiótica. Para esse processo ocorrer é necessário de 18 a 22 horas, e somente após esse período, os oócitos podem se tornar aptos para o processo de fertilização.

5.4. FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* – FIV

A utilização da fertilização *in vitro* vem sendo cada vez mais aplicada para a reprodução de bovinos e pode ser empregada a partir de diversas técnicas diferentes. Porém, a maioria

dessas técnicas utilizam o sêmen congelado, de forma que a dose permanece estocada no laboratório pronto para ser utilizada quando for necessário. O material é mantido congelado em razão desse processo otimizar o uso do sêmen, o que de acordo com Gimenez (2010) é o ideal, já que a concentração recomendada para a fertilização *in vitro* é de 2 milhões de espermatozoides por mililitro.

A realização de uma fertilização *in vitro* é feita a partir de etapas, e anteriormente ao início do procedimento, é necessário realizar o descongelamento da palheta de sêmen e submeter o material a um processo de seleção dos espermatozoides móveis, e após, submetê-lo também a um processo de remoção do diluidor e/ou do plasma seminal, que está além das células não espermáticas (LIMA, 2018).

Existem três principais técnicas que apoiam o desenvolvimento dessa série de processos, sendo elas, lavado espermático, *swim-up*, gradiente de Percoll. Entre essas três possibilidades, a mais indicada pela EMBRAPA (2014), que é também a mais utilizada é a técnica de gradiente de Percoll. De acordo com Renesto (2004), essa técnica é aplicada em quatro etapas, na primeira é criada uma solução de concentração gradual em que a densidade aumenta partindo da cama superior para a inferior. Na segunda etapa, o sêmen é colocado no topo dessa solução e centrifugado. Na terceira etapa, os espermatozoides que permanecem vivos são obrigados a percorrer todas as camadas de solução, e isso acontece em razão da força centrífuga que é exercida sobre eles. E na última etapa, é obtido um pellet contendo os espermatozoides selecionados.

A outra possibilidade de técnica que pode ser aplicada é o *swim-up*. Antonioli et al. (2005), explicam que essa técnica possui uma metodologia reversa, ou seja, a amostra seminal é, primeiramente, depositada no fundo de um tubo que precisa estar previamente aquecido. Dentro desse tubo, é preciso estar o sperm-TALP, a partir do qual os espermatozoides móveis vão migrar até a superfície.

Após a fase inicial da fertilização *in vitro*, que consiste em realizar a seleção espermática, entra-se na fase de depositar os gametas em uma placa. A placa em que os gametas serão depositados precisa ter um meio adequado para a capacitação dos espermatozoides e para a fertilização dos oócitos. O início realmente da fertilização *in vitro* ocorre quando o processo de capacitação dos espermatozoides é iniciado a partir do uso de glicosaminoglicanas que se encontram presentes no meio da fecundação e tem o papel de torná-los capazes de se ligarem aos receptores da zona pelúcida. Essa ligação é de grande importância para o procedimento como um todo, pois é a ligação que promove a liberação do conteúdo acrossômico e, conseqüentemente, a fusão da membrana vitelínica, o que por sua vez, é responsável por

desencadear a liberação dos grânulos corticais e fazer o bloqueio da polispermia (EMBRAPA, 2014).

O principal objetivo da realização de uma fertilização *in vitro* é fazer com que a fertilização e o desenvolvimento de embriões realmente resultem em uma gestação. Para isso, diversas possibilidades podem ser empregadas com a finalidade de aumentar as taxas de gestações, algumas dessas possibilidades que são mais frequentemente aplicadas são, TALP e TL. Esses meios podem ser suplementados com diversos suplementos, e existem diversos autores que discutem a aplicação de determinadas substâncias. Gimenes (2010), defende a aplicação de antibióticos gentamicina ou penicilina, e de albumina sérica bovina. Já Lima (2018), acredita que a melhor opção é a suplementação com piruvato. E Antonioli (2005), Renesto (2004), e Dayan (2001) concordam que as melhores opções são a hipotaurina, a epinefrina, e a heparina.

Na aplicação da fertilização *in vitro*, assim como no transporte de oócitos, também se discute a possibilidade de trabalhar com diferentes atmosferas gasosas. Nesse sentido, Santos et al. (2018), desenvolveram uma pesquisa comparativa, que tinha como objetivo expor os oócitos a diferentes tensões de oxigênio, e a partir dos resultados encontrados, concluíram que mesmo em baixos níveis de oxigênio, a taxa de produção *in vitro* de embriões continua a mesma, não existindo nesse procedimento, influência dos níveis de oxigênio.

Assim como no processo de maturação *in vitro*, na fertilização *in vitro*, também existe uma grande busca por técnicas que permitem uma redução nos custos desse processo, ao mesmo tempo que otimizem os meios que são destinados à FIV. Gilardi et al. (2004), é um dos pesquisadores que buscam essa redução de custos, observaram que uma possibilidade é o impacto do soro fetal bovino na técnica de fertilização *in vitro*, como a diminuição da taxa de clivagem inicial e o aumento do desenvolvimento embrionário consecutivo. Em seu trabalho, os autores observaram que a utilização da albumina sérica bovina possibilita uma melhora na clivagem dos embriões, resultado esse, que também é afirmado por outros autores, como Gimenes (2010) e Antonioli (2005).

5.5. CULTIVO DOS EMBRIÕES *IN VITRO* – CIV

A realização do cultivo dos embriões *in vitro* é mais uma fase do processo de reprodução bovino. Nessa fase ocorre o fornecimento de um ambiente que seja adequado para o desenvolvimento embrionário, além da realização do acompanhamento das etapas desse desenvolvimento. De acordo com a EMBRAPA (2014), durante o período em que o embrião está no ambiente em que será desenvolvido, ele passa por uma série de importantes mudanças,

como, a clivagem, a ativação do genoma embrionário, a compactação dos blastômeros, a diferenciação do trofoblasto e do embrioblasto, a formação e a expansão do blastocele, e o rompimento da zona pelúcida.

Os meios utilizados para o cultivo dos embriões são diferentes dos meios utilizados para a fertilização *in vitro*, isso porque, o ambiente onde ocorre a fertilização *in vitro* tem como objetivo proporcionar uma atmosfera para a capacitação e manutenção dos espermatozoides, enquanto os meios utilizados para o cultivo, visam a nutrição e a divisão das células dos embriões. Nesse sentido, quando terminado a fase de fertilização *in vitro*, as estruturas são transferidas para outra placa, na qual as células de cumulus são retiradas com o auxílio da pipeta e da hialuronidase, e são deixados somente os prováveis zigotos desnudos (GIMENEZ, 2010).

No processo de escolha do meio de cultivo a ser utilizado, diversas metodologias estão disponíveis, podendo ser aplicadas nesse processo. Esse entendimento também ocorre com relação a frequência do feeding, o qual é definido como a mudança ou renovação do meio, sendo realizado com o objetivo de manter os embriões sempre nutridos nesse ambiente. Entre as possibilidades de escolha, o meio mais utilizado para o cultivo é o SOF – fluídos sintéticos do oviduto. Nesse meio, as variações ocorrem, na grande maioria das vezes, nas substâncias que são adicionadas ao mesmo, como os aminoácidos essenciais ou a gentamicina (LIMA, 2018; ANTONIOLLI, 2005). Outros autores também discutem a escolha do melhor meio para o cultivo, nesse sentido, Dayan (2001) enfatiza que a melhor escolha é o CR2 suplementado com soro fetal bovino, enquanto a EMBRAPA (2014) defende o SOF com adição de SFB, albumina sérica bovina – BSA, aminoácidos, piruvato, lactato e glutamina.

Muitos autores discutem também a frequência em que deve ocorrer a adição no meio do cultivo, e com o desenvolvimento de suas determinadas pesquisas, encontraram possibilidades em relação a frequência da adição. Renesto (2014), em seu trabalho, realizou a adição no terceiro e quinto dia após a fertilização, já Dayan (2001), vai de encontro com o sugerido pela EMBRAPA (2014), que recomenda um único feeding, realizado após 48 horas da fertilização *in vitro*. Durante o processo de adição, Dayan (2001), enfatiza ainda a necessidade de realizar, em conjunto com a adição, uma análise de como está o desenvolvimento embrionário e sua taxa de clivagem, identificando quantos embriões atingiram o estado de mórula, blastocisto, ou quais não evoluíram.

5.6. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO – TE

A última etapa de produção *in vitro* do embrião consiste na transferência desse embrião. Esse procedimento é essencial para o sucesso da fertilização *in vitro* e tem início já na contenção do animal. Inicialmente deve ser feita uma anestesia epidural baixa com lidocaína a 2%, de

acordo com Dayan (2001), esse procedimento é realizado visando melhorar a manipulação do útero através do reto, na sequência, é feita a higienização da vulva para que seja evitado o risco de contaminação. Após essas duas etapas, é feita a introdução do inovulador na vagina, que passa a cérvix e deposita o embrião profundamente no útero, no corno ipsilateral ao ovário com corpo lúteo (FILHO, 2018).

Como forma de garantir altas de taxas de implantação embrionária é fundamental que as receptoras sejam submetidas a boas condições de manejo, como, nutrição, sanidade e bem-estar, que de acordo com Demczuk et al. (1998), são fatores que podem interferir diretamente no sucesso da gestação. Andrade et al. (2012), ainda enfatiza que esses fatores são de grande importância para o sucesso da gestação em razão dos embriões produzidos *in vitro* serem mais suscetíveis a aspectos como o estresse e variações que podem vir a ocorrer no meio.

Outro aspecto de grande importância para o sucesso da gestação é a sincronia do estágio do embrião com a fase do ciclo estral da vaca. Dayan (2001) e Filho (2018) afirmam que as melhores taxas de gestação são observadas, principalmente, entre o oitavo e décimo dia a partir do fim do protocolo hormonal. Nesse sentido, é durante esse período que o corpo lúteo se encontra ativo e o útero pronto para conceber.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pecuária brasileira vem passando nos últimos anos por um grande período de ascensão, a partir do qual esse tipo de negócio só cresce e, cada vez mais, conquista um importante lugar na economia brasileira e no desenvolvimento nacional, sendo responsável por grande parte do Produto Interno Bruto – PIB do país. A partir desse entendimento, cada vez mais, pesquisadores buscam novas ferramentas e novos procedimentos mais atualizados e mais modernos que podem apoiar o desenvolvimento da pecuária brasileira.

Dentro da pecuária, enfatiza-se ainda a importância da reprodução bovina para o negócio, identificando a importância também de técnicas científicas da medicina veterinária que contribuem para o desenvolvimento dessa área. Nesse sentido, identificou-se a produção *in vitro* de embriões, apresentando como essa técnica pode otimizar o uso do sêmen sexado, ao mesmo tempo que permite uma melhora no aproveitamento das fêmeas, o que faz com que a produção *in vitro* de embriões passe a ter um papel fundamental para a evolução da medicina veterinária brasileira.

Foram identificados diversos fatores que influenciam no sucesso da produção *in vitro* de embriões, e quais ações os profissionais da medicina veterinária devem realizar para garantir o sucesso da técnica. Entre esses fatores, é citado a importância da fase inicial do processo,

minimizando danos e estresses que podem impactar nos oócitos, e a importância da fase posterior, que acontece durante o cultivo do embrião, no qual é preciso desenvolver um ambiente que seja favorável ao desenvolvimento desse embrião.

Por ser uma área que vem crescendo e tomando cada vez mais espaço, e entendendo a importância da mesma para a economia brasileira, torna-se necessário manter o estudo e pesquisa sobre seu desenvolvimento e os fatores que podem impactá-la, para que assim seja possível manter um constante aprimoramento da técnica, melhorando a qualidade dos oócitos captados por meio da aspiração folicular, elucidando os processos de maturação, e otimizando o uso das receptoras.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, S.; FERNANDES, M.; KNYCHALA, R.; JUNIOR, M.; OLIVEIRA, A.; NUNES, D.; BONATO, G.; SANTOS, R. Fatores que afetam a taxa de prenhes de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 36, n. 1, p. 66-69, 2012.

ANTONIOLLI, C. **Produção *in vitro* de Embriões Bovinos Utilizando Diferentes Condições de Maturação**. Porto Alegre. Dissertação Mestrado em Reprodução Animal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 30p., 2005.

BARUSELLI, P.; ELLIFF, F.; SILVA, L.; CATUSSI, B.; BAYEUX, B. **Estratégias para Aumentar a Produção de Embriões em Bovinos**. XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Gramado – maio, 2019.

BECHER, B.; NETO, A.; OLIVEIRA, W.; MOTA, M.; JELONSCHEK, J. Fatores que afetam a produção *in vitro* de embriões (PIVE) em bovinos. **Enciclopédia Biosfera**. Goiânia, v. 15, n. 28, p. 554-569, 2018.

CONSELHO NACIONAL DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. **Comunicado Técnico: PIB Brasil**. Edição 17/2021.

CROCOMO, L.; FILHO, W.; LANDIM-ALVARENGA, F.; BICUDO, S. Aspectos bioquímicos e ultra estruturais da maturação oócitaria. **Veterinária e Zootecnia**. v. 18, n. 4, p. 542-552, 2011.

CROCOMO, L.; FILHO, W.; GUASTALI, M.; LANDIM-ALVARENGA, F. BICUDO, S. Aspectos ultra estruturais dos complexos cumulus-oócitos de mamíferos domésticos. **Veterinária e Zootecnia**. v. 20, n. 2, p. 171-182, 2013.

CRUZ, F.; MARTINS, L.; MARINHO, L.; FORELL, F.; VIEIRA, A.; MEZZALIRA, A. Aspiração folicular em vacas *Bou taurus* e *Bos indicus* e vitrificação dos oócitos em condições de campo. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages, v. 8, n. 2, p. 184-187, 2009.

CRUVINEL, L. **Recuperação de Oócitos em Doadoras Gir e Girolando**. Morrinhos. Trabalho de Conclusão de Curso. IFG – Instituto Federal de Goiás. 29p., 2019.

DANTAS, K.; CAMPELLO, C.; DANTAS, R.; NUNES, J. Seleção de receptoras em um programa de transferência de embriões (PIVE) em bovinos no nordeste do Brasil. **Ciência Animal**. v. 28, n. 1, p. 3-16, 2018.

DAYAN, A. **Fatores que Interferem na Produção de Embriões Bovinos Mediante Aspiração Folicular e Fecundação *in vitro***. Botucatu. Dissertação Mestrado em Reprodução Animal. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista. 569., 2001.

DEMCZUK, E.; KOZICKI, L.; PONTELLI, E.; SALLES, J. Transferência de embrião em vacas da raça Simental na região noroeste do Paraná e Sul do Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Ciência Animal**. São Paulo, v. 35, n. 4, p. 174-177, 1998.

EMBRAPA. Biotécnicas da Reprodução em Bovinos. **Documento Técnico**. Juiz de Fora. 1º Edição. 2014.

FIGUEIRÓ, G.; LEIVAS, F.; RAUBER, L.; FILHO, M.; TEICHMANN, C.; MEZZALIRA, A.; RUBIN, M.; SILVA, C. Produção *in vitro* de embriões bovinos com soro de égua ou de

vaca em estro com ou sem a adição de LH/FSH. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 34, n. 2, p. 479-484, 2004.

FILHO, G. **Taxa de Concepção e Gestação de Embriões Produzidos *in vitro*: Transferidos a Fresco ou Criopreservado em Vacas e Novilhas Nelore**. São Paulo. Dissertação Mestrado em Reprodução Animal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual de São Paulo. 33p., 2018.

GILARDI, S.; SÁ, W.; CAMARGO, L.; FERREIRA, A.; MACHADO, M.; SERAPIÃO, R.; SOARES, A.; PINHO, T.; VIANA, J. Efeito de diferentes meios de cultivo no desenvolvimento e proporção do sexo de embrião bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 56, n. 5, p. 623-627, 2004.

GIMENES, L. **Taxa de Recuperação *in vivo* e competência *in vitro* de Oócitos Bubalinos, Zebuínos e Taurinos Aspirados em Diferentes Fases da Onda de Crescimento Folicular**. São Paulo. Tese Doutorado em Reprodução Animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. 122p., 2010.

GONÇALVES, R.; VIANA, J. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. Gramado. 2019.

GUIMARÃES, A.; ROCHA, L.; JESUS, R.; VASCONCELOS, G.; ANGHINONI, G.; SANTANA, A.; BARBOSA, L. Desempenho de vacas doadoras zebuínas (*Bos indicus*) e taurinas (*Bos taurus*) na produção de embrião *in vitro*. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v. 21, p. 1-11, 2020.

GOUVEIA, F. **A Produção *in vitro* de Embriões Bovinos**. Brasília. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade de Brasília. 35p., 2011.

GOTTARDI, F.; MINGOTI, G. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 22, n. 2, p. 82-94, 2009.

HONORATO, M.; FERRO, R.; FERRO, D.; SANTOS, K.; COSTA, M.; FILHO, L. Importância da escolha de receptores em um programa de transferência de embriões em bovinos. **Revista PUBVET**. Londrina, v. 7, n. 19, Ed. 242, Art. 1601, 2013.

IBGE. **Pesquisa de Pecuária Municipal**. 2019.

JELONSCHEK, J.; NETO, A.; OLIVEIRA, W.; MOTA, M.; BECHER, B. Fatores que afetam a taxa de gestação de receptoras de embriões produzidos *in vitro*. **Scientific Electronic Archives**. v. 11, n. 6, p. 173-179, 2018.

LEIVAS, F.; BRUM, D.; MEZZALIRA, A.; PILLA, L.; BERNARDI, M.; RUBIN, M.; SILVA, C. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 219-224, 2004.

LIMA, C. **A Relação entre a Cinética de Clivagem e a Resposta Metabólica de Embriões Bovinos submetidos à Condições Estressoras durante o Cultivo *in vitro***. São Paulo. Tese Doutorado em Biotecnologia. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. 117p., 2018.

LUEDKE, F.; LAVACH, F.; CASSANTA, F.; NUNES, L.; SCHLOTEFELD, C.; PAIVA, S.; SANTOS, S.; NEVES, A. Aspectos da produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**. Porto Alegre, v. 25, n. 1, p. 120-132, 2019.

MAPA. **Comunicado Técnico**. Agropecuária Brasileira em Números. 2020.

MONTAGNER, M.; GONÇALVES, P.; NEVES, J.; COSTA, L.; BORTOLOTTI, E.; FARIAS, A.; STRANIERI, P. Hepes na produção de embriões bovinos *in vitro*. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 469-474, 2000.

PFEIFER, L.; CAMPOS, H.; MIGUEL, J.; SILVEIRA, L.; SCHNEIDER, A.; CORREA, M.; RUMPF, R. Aumento da qualidade de ovócitos recuperados por punção folicular de vacas submetidas previamente à superovulação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 35, n. 3, p. 363-367, 2011.

PEREIRA, J. *et al.* Recuperação de oócitos em bovinos da raça Guzerá e Holandesa. **Revista Eletrônica Biociências, Biotecnologia e Saúde**. Curitiba, n. 19, 2017.

PINHO, G. **Índices de Recuperação de Oócitos e Produção de Embriões por Fecundação *in vitro* nas Raças Gir Leireiro, Holandês e Girolando**. Trabalho de Conclusão de Curso. Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – UNICEPLAC. 16p., 2019.

RAMOS, A.; FERREIRA, A.; SÁ, W.; VIANA, J.; CAMARGO, L.; POLISSENI, J.; HENRY, M. Efeito da somatotropina na população folicular, recuperação de oócitos e produção *in vitro* de embriões em vacas Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 36, n. 2, p. 380-386, 2007.

RENESTO, A. **Associação das Biotécnicas: Aspiração Folicular guiada por Ultra-Sonografia e Superovulação na produção *in vitro* e *in vivo* de Embriões Bovinos**. São Paulo. Dissertação Mestrado em Reprodução Animal. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Estadual Paulista. 59p., 2004.

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

SANTOS, M.; BORGES, A.; QUEIROZ-NETA, L.; PEREIRA, A. Influência do método de recuperação oocitária sobre os parâmetros quanti-qualitativos de oócitos bovinos. **ARS Veterinária**. Jaboticabal. v.32, n. 2, p. 105-109, 2016.

SANTOS, M.; PEREIRA, D.; ORTIZ, G.; OLIVEIRA, S.; SILVA, A.; SOUZA-CÁCERES, M.; CARDOSO, C.; MELO-STERZA, F. **Cultivo de embriões bovinos em diferentes tensões de oxigênio**. XXIII Congresso Brasileiro de Zootecnia. Goiânia, 2018.

SENEDA, M.; RUBIN, K.; BLASCHI, W.; LISBOA, L.; PONTES, J. Utilização de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para a aspiração folicular transvaginal guiada pela ultra-sonografia. **Revista de Educação Continuada**. São Paulo, v. 8, n. 2, p. 168-175, 2005.

VIANA, J.; FIGUEIREDO, A.; SIQUEIRA, L. Brazilian embryo industry in context: Pitfalls, lessons and exceptions for the future. **Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society**. Cabo de Santo Agostinho. 2017.

VIANA, J.; FIGUEIREDO, A. Produção de embriões bovinos em 2014 e 2015: Reflexos de um período de turbulências. **Jornal o Embrião**. Foz do Iguaçu. 2º Semestre. Edição 58º. p. 6-10, 2016.

VIANA, J.; BOLS, P. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus-oócito por aspiração folicular. **ACTA Scientiae Veterinariae**. v. 33, n. 1, p. 1-14, 2005.