



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO)
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS: DA OPU À TE
REVISÃO DE LITERATURA

DIOGO TORREÃO PECLY

RECIFE, 2021



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS: DA OPU À TE
REVISÃO DE LITERATURA**

Relatório de Estágio Supervisionado Obrigatório
realizado como exigência parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Medicina Veterinária, sob Orientação do
Prof. Dr. André Mariano Batista.

DIOGO TORREÃO PECLY

RECIFE, 2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T689p Torreão Pecly, Diogo
Produção In Vitro de Embriões Bovinos: da OPU à TE: Revisão de Literatura / Diogo Torreão Pecly. - 2021.
35 f. : il.

Orientador: Andre Mariano Batista.
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em
Medicina Veterinária, Recife, 2021.

1. Reprodução. 2. Bovino. 3. IATF. 4. Oócito. 5. Embrião. I. Batista, Andre Mariano, orient. II. Título

CDD 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS: DA OPU À TE

REVISÃO DE LITERATURA

Relatório elaborado por
DIOGO TORREÃO PECLY

Aprovado em __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. André Mariano Batista
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Membro: Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Membro: Prof. Msc. Rafael Artur da Silva Júnior
Centro Universitário Brasileiro - UNIBRA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Brete de contenção bovino.....	12
Figura 2: Curral.....	13
Figura 3: Sala de escritório do laboratório Nordeste <i>In Vitro</i>	14
Figura 4: Sala de esterilização do laboratório Nordeste <i>In Vitro</i>	14
Figura 5: Sala de sêmen do laboratório Nordeste <i>In Vitro</i>	15
Figura 6: Sala de embrião do laboratório Nordeste <i>In Vitro</i>	15
Figura 7: Mesa montada para Aspiração Folicular (<i>Ovum Pick Up</i> – OPU).....	16
Figura 8: Mesa montada para Transferência de Embriões (TE).....	16
Figura 9: Mesa para seleção de oócitos.....	17
Figura 10: Bovinos Nelore (SE).....	17
Figura 11: Bovinos Guzerá (AL).....	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação quantitativa de animais *B. taurus* e *B. indicus* que passaram por avaliação reprodutiva através do aparelho de ultrassom. 18

Tabela 2: Número de animais submetidos à OPU e a relação dos oócitos coletados, oócitos convertidos em embriões, e os embriões que atingiram a fase de blastocisto. 19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OPU – *Ovum Pick Up*

IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo

TE – Transferência de Embrião

FIV – Fertilização *In Vitro*

PIVE – Produção *In Vitro* de Embriões

MIV – Maturação *In Vitro*

ICSI – Injeção Intracitoplasmática de espermatozoide

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

rbST – Somatotropina Recombinante Bovina

COC – Complexo cumulus-oócito

RESUMO

O presente relatório descreve as atividades realizadas durante a imersão do discente na rotina de duas empresas da área de reprodução bovina, perfazendo total de 420 horas, no contexto do Estágio Supervisionado Obrigatório. A FertVet Consultoria Veterinária, especializada em inseminação artificial bovina, tem locais de trabalho espalhados por dezenas de municípios da região Nordeste, principalmente nos estados de Sergipe e Bahia. Enquanto, a empresa Nordeste *In Vitro*, atua principalmente na produção *in vitro* de embriões em Sergipe, Pernambuco, Alagoas e Rio Grande do Norte. As práticas do discente foram diretamente supervisionadas por um diretor-veterinário, em cada empresa. Respectivamente, os médicos veterinários Felipe Costa Almeida e Lucas Carvalho Pereira. As atividades realizadas, concentraram-se no acompanhamento reprodutivo da fêmea bovina, desde o diagnóstico do status reprodutivo por meio de ultrassonografia, passando pelos protocolos de indução e sincronização do estro; inseminação artificial em tempo fixo (IATF), aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU), além de todas as etapas da produção *in vitro* de embriões, até a transferência para as receptoras. Em complemento às observações práticas, foi realizada uma revisão de literatura dos aspectos técnicos e científicos do processo de produção *in vitro* de embriões bovinos. O Estágio Supervisionado Obrigatório é parte crucial e definidora no processo de formação do médico veterinário, quando a teoria, a prática e as aspirações ao mercado de trabalho se encontram. No que se refere às técnicas reprodutivas em vacas, foco deste trabalho, o ESO serviu ao entendimento do manejo geral (etapa a etapa) dentro de uma fazenda, da logística de um veterinário de campo e do caminho a trilhar para inserção no mercado de trabalho.

Palavras-chave: reprodução; bovino; IATF; oócito; embrião

ABSTRACT

This report reports activities carried out during the immersion of the student in the routine of two companies in the area of bovine reproduction, totaling 420 hours, in the context of the Mandatory Supervised Internship. FertVet Consultoria Veterinária, specialized in artificial bovine insemination, has workplaces spread over dozens of municipalities in the Northeast region, mainly in the states of Sergipe and Bahia. Meanwhile, the company Nordeste *In Vitro*, operates mainly in the in vitro production of embryos in Sergipe, Pernambuco, Alagoas and Rio Grande do Norte. The student's practices were directly supervised by a veterinary director in each company. Respectively, veterinarians Felipe Costa Almeida and Lucas Carvalho Pereira. The activities carried out focused on the reproductive monitoring of the bovine female, from the diagnosis of the reproductive status through ultrasonography, through the estrus induction and synchronization protocols; fixed-time artificial insemination (IATF), ultrasound-guided follicular aspiration (OPU), in addition to all stages of in vitro embryo production, up to transfer to recipients. In addition to the practices, a literature review of the technical and scientific aspects of the in vitro production process of bovine embryos was carried out. The Mandatory Supervised Internship is a crucial and defining part of the veterinarian training process, when a theory, a practice and aspirations for the labor market are identified. With regard to reproductive techniques in cows, the focus of this work, ESO serves the understanding of general management (step by step) within a farm, of the logistics of a field veterinarian on the way to enter the labor market.

Keywords: reproduction; bovine; oocyte; IATF; embryo

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	11
1. INTRODUÇÃO	11
2. DESCRIÇÃO DOS LOCAIS DE ESTÁGIO	12
2.1 FertVet Consultoria Veterinária	12
2.2 Nordeste <i>In Vitro</i>	13
3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES REALIZADAS NA FERTVET CONSULTORIA VETERINARIA	18
3.1 Casuística acompanhada na FertVet Consultoria Veterinária	18
4. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES NA NORDESTE <i>IN VITRO</i>	19
4.1 Casuística acompanhada na Nordeste <i>In Vitro</i>	19
5. CONCLUSÃO	20
CAPÍTULO II	21
1. REVISAO DE LITERATURA	21
RESUMO	21
1.1 Introdução	22
1.2 Seleção e avaliação de receptoras e doadoras	24
1.3 Aspiração folicular	25
1.4 Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	27
1.5 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	29
1.6 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	30
1.7 Transferência de embrião (TE)	31
1.8 Considerações finais	32
REFERÊNCIAS	33

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO), é referente ao último ou décimo primeiro período do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Tem como propósito, imergir os discentes em um período de 420 horas práticas na área de maior interesse que o mesmo pretende atuar ao término da graduação.

Este relatório, diz respeito ao ESO desenvolvido na área de reprodução animal com ênfase em bovinos, por meio do acompanhamento dos profissionais que integram a empresa FertVet Consultoria Veterinária, supervisionado pelo médico veterinário e mestre Felipe Costa Almeida, no período de 05 de abril à 17 de maio; e na empresa Nordeste *In Vitro*, supervisionado pelo médico veterinário e mestre Lucas Carvalho Pereira, no período 18 de maio à 18 de junho.

O objetivo desses estágios foi vivenciar e aprimorar os conhecimentos teóricos aprendidos durante o tempo de graduação na área de reprodução animal. Além de conhecer mais a fundo o mercado de trabalho rural e a economia do campo.

2. DESCRIÇÃO DOS LOCAIS DE ESTÁGIO

2.1 FertVet Consultoria Veterinária

A empresa FertVet Consultoria Veterinária, fundada em 2014, tem como sede a cidade de Aracaju e é atualmente composta por dois sócios, os médicos veterinários Felipe Almeida e Fábio Almeida, que empregam outros dois funcionários, os também médicos veterinários Ludmila Reis e Emanuel Soares. O estágio com a equipe FertVet teve início no dia 05 de abril de 2021 e foi até o dia 17 de maio, totalizando 240 horas práticas.

As atividades aconteciam basicamente de segunda à sábado e aos domingos, apenas quando necessário. O horário de trabalho da empresa começa cedo, às 5 horas da manhã, tendo em vista as distâncias e a logística até a chegada às propriedades rurais, além do tempo para organização de material e estrutura necessários aos trabalhos. O material ficava guardado em um depósito para utilização sempre que necessário. O retorno das atividades ocorriam geralmente ao anoitecer.

Durante o tempo de estágio, o discente acompanhou a equipe de veterinários em viagens à diversas propriedades rurais, localizadas principalmente nos estados de Sergipe e Bahia. Dentre os municípios percorridos estão: Maruim, Nossa Senhora da Glória, Nossa Senhora das Dores, Laranjeiras, Feira Nova, São Miguel do Aleixo, Boquim, Riachão do Dantas, Jandaíra, Cristinápolis, Riachuelo, Crasto, Antas, Cícero Dantas, Ribeiro do Pombal, Itabaiana e Estância.

As instalações requeridas para desenvolvimento do trabalho baseavam-se principalmente em bretes de contenção (Figura 1) para animais da espécie bovina, e currais com estrutura adequada de suporte para estes animais (Figura 2).



Figura 1: Brete de contenção. **Fonte:** Acervo Pessoal (2021).



Figura 2: Curral. **Fonte:** Acervo Pessoal (2021).

2.2 Nordeste In Vitro

A empresa Nordeste *In Vitro*, dedica-se ao ramo de reprodução animal desde 2014, tem como sede o laboratório localizado na cidade de Maceió e é formada pelo diretor da empresa, o médico veterinário Lucas Carvalho, pelo selecionador de oócitos Walleson Cunha, pelo biomédico Erick Vasquez, pela zootecnista Andressa Moreira, pelo médico veterinário Tárccio Araújo e pelo auxiliar Elias José. O estágio com a equipe Nordeste *In Vitro* foi do dia 18 de maio de 2021 ao dia 18 de junho de 2021, totalizando 180 horas práticas.

As atividades eram desenvolvidas durante toda a semana, de domingo a domingo, e começavam às 5 horas da manhã, por conta das distâncias percorridas até as propriedades rurais. Durante o período de estágio, o discente acompanhou trabalhos nos estados de Pernambuco, Alagoas e Sergipe, nos municípios, para listar alguns, Chã Preta, Murici, Palmares, Quipapá, Campo do Brito, Joaquim Gomes, Flexeiras, Boca da Mata, Cacimbinhas, Major Isidoro, Batalha, Pilar, Carira, Campo Alegre e Junqueiro.

O laboratório da Nordeste *In Vitro*, conta com uma sala de escritório (Figura 4), onde eram tratadas questões burocráticas; a sala de esterilização (Figura 5), na qual era realizada a esterilização de materiais e ferramentas - primeiro na autoclave e posteriormente na estufa.

Esses ambientes compreendiam a “área suja”. A “área limpa”, compreendiam dois espaços: a sala de sêmen (Figura 6), onde são estocados os materiais estéreis e os botijões de sêmen; e sala de embrião (Figura 7), onde ocorriam todas as etapas para a produção *in vitro* de embriões. No campo, as estruturas necessárias aos trabalhos incluíam brete de contenção para bovinos e curral para manejo dos animais, além de mesas para:

- Organização dos materiais para aspiração folicular - OPU (Figura 8)
- Transferência de embrião - TE (Figura 9)
- Seleção dos oócitos (Figura 10). Esta última ficava sempre fora do curral, em ambiente limpo.



Figura 3: Sala de escritório. **Fonte:** Acervo Pessoal (2021).



Figura 4: Sala de esterilização. **Fonte:** Acervo Pessoal (2021).



Figura 5: Sala de sêmen. **Fonte:** Acervo Pessoal (2021).



Figura 6: Sala de embrião. **Fonte:** Acervo Pessoal (2021).



Figura 7: Mesa organizada para aspiração folicular - OPU. **Fonte:** Acervo Pessoal (2021).



Figura 8: Mesa organizada para transferência de embrião - TE. **Fonte:** Acervo Pessoal (2021).



Figura 9: Mesa organizada para seleção de óocitos. **Fonte:** Acervo Pessoal (2021).



Figura 10 : Bovinos Nelore (SE). **Fonte:** Acervo Pessoal (2021).



Figura 11: Bovinos Guzera (AL). **Fonte:** Acervo Pessoal (2021).

3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES REALIZADAS COM A FERTVET CONSULTORIA VETERINÁRIA

A rotina da empresa FertVet Consultoria Veterinária baseia-se principalmente em serviços reprodutivos na espécie bovina, os quais incluem exames andrológicos de touros, avaliação do sistema reprodutivo de vacas, inseminação artificial por tempo fixo (IATF) e diagnóstico de gestação. Além disso, também exercem atividades de representação comercial de duas centrais internacionais de sêmen, fornecendo palhetas de sêmen congelado a produtores interessados em melhorar a qualidade genética do rebanho. O período relativo ao estágio na empresa aconteceu de abril a maio, quando chega ao fim a estação de monta na região. Nesse período, a maior rotatividade de serviços ofertados pela FertVet foi o diagnóstico gestacional.

3.1 Casuística acompanhada com a FertVet Consultoria Veterinária

Durante o ESO, foi possível acompanhar avaliações do trato reprodutivo de vacas por meio do aparelho de ultrassonografia. Analisavam-se condições do útero de vacas no pós-parto, além de avaliação reprodutiva para IATF e do diagnóstico gestacional propriamente dito. Dentre as 3.600 vacas avaliadas, 1.200 eram da espécie *Bos taurus taurus* e 2.400 da espécie *Bos taurus indicus*, conforme tabela abaixo.

Tabela 1: Número de animais *B. taurus* e *B. indicus* que passaram por avaliação reprodutiva por meio do aparelho de ultrassom.

ESPECIE	QUANTIDADE	PORCENTAGEM
<i>B. indicus</i>	2.400	66,6%
<i>B. taurus</i>	1.200	33,3%
TOTAL	3.600	100%

Fonte: Arquivo Pessoal (2021)

No que diz respeito, às avaliações para atestar condições uterinas adequadas à manutenção da gestação, por causa da proximidade do fim da estação de monta, o discente acompanhou apenas avaliações na espécie *B. taurus taurus*. Essas avaliações constataram que, de 500 vacas no pós-parto, 75 estavam aptas a participar do protocolo hormonal para serem posteriormente inseminadas, ou seja, apenas 15% do total de vacas avaliadas, para serem submetidas a IATF, apresentaram condições uterinas de conceber.

O discente acompanhou o processo de diagnóstico gestacional em todos os 3.600

animais, dos quais 79% das vacas zebuínas confirmaram prenhez após protocolos de IATF e uso do touro de repasse, já nas vacas taurinas apenas 40% apresentavam-se gestantes.

4. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES REALIZADAS NA NORDESTE *IN VITRO*

A Nordeste *In Vitro* se dedica à melhoria genética de rebanhos por meio de embriões produzidos em laboratório, fruto do cruzamento de animais com alto valor zootécnico. A rotina do estagiário se iniciava no laboratório da empresa, antes do amanhecer. Depois de auxiliar na organização dos materiais, a equipe partia, por volta das 5 horas da manhã, com destino às propriedades rurais.

Nas fazendas, as atividades eram realizadas na seguinte ordem: avaliação das doadoras para estimar a quantidade de oócitos que seriam coletados e possivelmente convertidos em embriões; avaliação das receptoras quanto à condição uterina; ovários ativos e sinuosidade da cérvix; início do protocolo hormonal nas receptoras; realização da OPU nas vacas doadoras; no laboratório: maturação dos oócitos; Fertilização *in vitro* (FIV), cultivo dos embriões; identificação da ovulação na vaca receptora e transferência do embrião (TE). Após 30 dias, realizava-se o diagnóstico gestacional das vacas receptoras que haviam sido submetidas a TE.

4.1 Casuística acompanhada na Nordeste *In Vitro*

Dentre as doadoras submetidas a OPU, estavam vacas das raças Nelore, Gir, Girolando meio sangue e Wagyu. As receptoras são, na grande maioria, novilhas sem raça definida ou novilhas meio sangue Nelore. É possível observar na tabela abaixo a casuística de doadoras submetidas à aspiração folicular.

Tabela 2: Número de animais submetidos a OPU e os números de oócitos coletados, oócitos clivados e embriões que atingiram a fase de blastocisto.

RAÇA	N	OÓCITOS	CLIVAGEM	BLASTOCISTOS
NELORE	160	5.459	4.322	3.304
GIR	105	2.021	1.661	1.148
GIROLANDO	41	1.182	1.004	728
WAGYU	12	362	319	224
TOTAL	318	9.024	7.306	5.404

Fonte: Arquivo Pessoal (2021).

A média de oócitos aspirados por animal da raça Nelore foi igual a 34, a mais alta dentre as raças acompanhadas. Em seguida estão as vacas Wagyu, que apresentaram média de 30 oócitos; as Girolando, com 28 oócitos por aspiração e finalmente, as vacas Gir com média de 19 oócitos por aspiração. Em relação à proporção de oócitos fertilizados, a Wagyu apresentou a maior taxa, 88%. As vacas Girolando tiveram 84% dos oócitos fertilizados; e as Nelore 79%. Já na evolução até a fase embrionária de blastocisto, observamos as proporções de 76%, 72%, 70%, 69% nas respectivas raças Nelore, Girolando, Wagyu, Gir.

5. CONCLUSÃO

A graduação em Medicina Veterinária apresenta ao discente diversas oportunidades e faz despertar diversos interesses em diferentes áreas. Os estágios e projetos científicos guiam o aluno dentro da universidade. Mas é apenas durante o Estágio Supervisionado Obrigatório que o discente consegue realmente focar na área de predileção, e vivenciar de maneira mais intensa a rotina profissional que deseja seguir, e coloca à prova suas expectativas sobre a área.

No estágio relatado, foi possível vivenciar o dia-a-dia de um veterinário especializado em reprodução bovina à campo, colocando em prática os protocolos hormonais aprendidos na teoria durante a graduação; além de aprender o manejo geral de uma fazenda, e o papel e a importância de um veterinário dentro da economia rural. Tendo em vista que o mercado da pecuária está em alta e os serviços acompanhados nesse estágio (IATF e PIVE), têm alta participação dentro do lucro da fazenda, o veterinário especialista em reprodução se torna peça chave dentro de cada unidade produtiva. O estágio criou ainda oportunidades para aperfeiçoar conhecimentos anatômicos por meio da palpação retal em vacas; treinar e aperfeiçoar a capacidade de diagnóstico de gestação com e sem a ajuda do aparelho de ultrassom; selecionar e classificar oócitos bovinos coletados *in vivo* e acompanhar integralmente o processo de PIVE.

O ESO é uma experiência importante na formação acadêmica porque norteia o discente quanto ao mercado profissional, e possibilita ao aluno viver na prática o que aprendeu durante os anos de graduação.

1. CAPÍTULO II - PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS: DA OPU À TE - REVISÃO DE LITERATURA

RESUMO

O setor agropecuário se encontra em ascensão e impulsiona a economia nacional conforme se desenvolve. A aplicação de tecnologias que promovem maior desempenho e eficiência dos animais se torna imprescindível no desenvolvimento dos rebanhos brasileiros. A produção *in vitro* de embriões bovinos passou por importantes transformações nas últimas duas décadas e é responsável - em programas de TE - pela atual posição do Brasil no contexto mundial. Diversos fatores influenciam a produção de embriões *in vitro* como manejo, nutrição, sanidade e competência oocitária. Na atualidade, vários estudos têm sido desenvolvidos para elaborar estratégias que contornem estes desafios e aumentem a eficiência da técnica. Nesse contexto, objetiva-se com essa revisão discutir e descrever as principais etapas da produção de embriões *in vitro* (PIVE) em bovinos - OPU, maturação, fecundação e cultivo *in vitro*.

1.1 Introdução

A pecuária é um dos principais pilares da economia brasileira, com participação essencial no Produto Interno Bruto (PIB) do país, e por isso se encontra em constante desenvolvimento e renovação. Em 2019, houve produção bruta de 223 bilhões de reais, relacionados à um rebanho bovino de mais de 214 milhões de animais (IBGE, 2019). Em 2020 o valor bruto da produção aumentou quase 6%, a despeito da pandemia da Covid-19, atingindo um montante de 236 bilhões de reais (MAPA, 2020). E continuou crescendo no primeiro trimestre de 2021 – com aumento de 1,2% na comparação com os três últimos meses do ano anterior (CNA, 2021). Esses números são uma ilustração rápida da importância dos rebanhos bovinos para o crescimento da economia brasileira, e muito se devem ao desenvolvimento da biotecnologia animal voltada à reprodução.

As tecnologias voltadas à reprodução bovina avançaram a passos lentos no Brasil, em comparação com o resto do mundo (VIANA et al., 2017). O momento atual brasileiro de desenvolvimento da biotecnologia animal já foi visto como utópico (GONÇALVES, 2019), por isso, é importante exaltar cada fase do progresso científico para entender como o país superou impasses da ordem de investimento e tecnológicos, para ocupar lugar de destaque mundial no setor.

A produção *in vitro* de embriões (PIVE), atual e mais cobiçada técnica de reprodução bovina, passou por longo e árduo processo de evolução (VIANA et al., 2017). Na década de 1990, antes da produção *in vitro*, o Brasil era responsável por apenas 6,6% da produção mundial de embriões bovinos. Esse número subiu para 8,1% no início dos anos 2000, e saltou para escandalosos 48% do total mundial de embriões produzidos com a chegada da PIVE (GONÇALVES, 2019).

Antes da PIVE, a inseminação artificial por tempo fixo, a formação de bancos de sêmen, a superovulação (SOV), acompanhada da transferência de embrião (TE) – que deu origem à MOTE (múltipla ovulação e transferência de embrião) – contribuíram para o avanço científico e estão disponíveis aos programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos (RUMPF, 2007). A PIVE marca a transição para ferramentas ainda mais modernas, como a vitrificação e congelamento de embriões, a clonagem e até mesmo a modificação de material genético (transgenia).

Em 2017, pela primeira vez nos registros mundiais, observou-se número maior de embriões produzidos *in vitro* comparado aos produzidos *in vivo*. O ano de 2017 marca a consolidação, por assim dizer, da técnica de produção *in vitro* de embriões aplicada em bovinos.

O Brasil se estabeleceu, então, no segundo lugar do páreo mundial, responsável por 34,8% da produção mundial de embriões (*in vivo* + *in vitro*), perdendo somente para os Estados Unidos, que tinha 45,3% (GONÇALVES, 2019).

Durante a trajetória de desenvolvimento da produção *in vitro* de embriões no Brasil, é possível identificar a predominância inicial das raças zebuínas de corte. Isso acabou criando o paradigma de que a nova tecnologia só seria viável nessas raças, em função do grande número de oócitos recuperados. Em outras palavras, o sucesso comercial da PIVE no Brasil foi considerado, inicialmente, um fato excepcional e localizado, descolado do mercado mundial de embriões. Esse paradigma não demorou muito a ser quebrado, e o Brasil logo se aproximou do perfil dominante no mercado internacional (VIANA, 2016). Por exemplo, PEREIRA et al. (2017) não constataram diferença entre as raças guzerá (zebuína) e holandesa (taurina) na recuperação de oócitos.

PINHO (2019) e CRUVINEL (2019), no entanto, observaram maior predominância de oócitos em raças zebuínas em comparação às taurinas, além de aumento expressivo na quantidade e na qualidade de oócitos de vacas originadas do cruzamento de *B. Taurus* e *B. Indicus*. GUIMARÃES et al. (2020) se propuseram a analisar de forma mais ampla o sucesso de gestações desenvolvidas por PIVE nas raças taurinas e nas zebuínas. Além das taxas de coleta e de qualidade de oócitos, consideraram a conversão para embrião e a implantação dos embriões, e concluíram que não há diferença significativa no sucesso de gestações entre as raças. Ou seja, considerada a taxa de diagnósticos positivos de gestação por PIVE, o fato de as raças zebuínas apresentarem mais oócitos se torna irrelevante.

A PIVE trouxe diversas vantagens aos programas de reprodução. Podemos citar algumas: o aumento do potencial de multiplicação de animais com alto valor genético e zootécnico; o aprimoramento das técnicas de maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI); a utilização de bezerras pré-púberes, vacas em início de gestação, vacas com subfertilidade adquiridas e vacas senis; e otimização no uso de doses de sêmen sexado (RUMPF, 2007).

Com base no exposto, esta revisão de literatura tem como objetivo abordar tecnicamente as etapas que envolvem a produção *in vitro* de embriões a saber:

1. Seleção e avaliação de vacas receptoras e doadoras;
2. Aspiração folicular ou colheita de oócitos;
3. Maturação *in vitro* dos oócitos;
4. Fertilização *in vitro*;
5. Cultivo *in vitro* dos embriões (CIV);

6. Transferência dos embriões para as vacas receptoras.

1.2 Seleção e avaliação de receptoras e doadoras

O sucesso do processo de produção *in vitro* de embrião está relacionado a diversos fatores. Becher et al. (2018), citam: 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. Ainda, os autores fazem referência à concentração plasmática do hormônio anti-mulleriano como indicador de qualidade e quantidade dos oócitos a serem coletados; ao fornecimento de sais minerais integrado à dieta dos animais (principalmente o selênio, que está diretamente relacionado à qualidade dos oócitos); à detecção de folículos dominantes ou de corpo lúteo, que podem interferir na qualidade dos oócitos; e à 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 essencial para êxito da PIVE que tanto as vacas doadoras quanto as receptoras estejam integradas a um manejo nutricional de qualidade (por exemplo, o fornecimento de sal mineral), além do manejo sanitário. A administração de vacinas contra IBR, BVD e leptospirose principalmente, segundo os autores, se refletem na diminuição das perdas por aborto ou absorção embrionária. Por último, apontam que o bem-estar animal (por exemplo, se a vaca entra e sai do brete de contenção correndo e agitada, ou caminhando e calma), também impacta nas taxas de concepção.

Por outro lado, autores também demonstraram quais variáveis não precisam, necessariamente, ser levadas em consideração. Em um estudo, Dantas et al. (2018), constataram que as receptoras devem passar por, no mínimo, quatro avaliações no processo da PIVE. A primeira para possível seleção do animal; a segunda avaliação para determinar o nível de resposta da fêmea selecionada depois do protocolo hormonal; a terceira para diagnosticar a gestação; e a última para identificar quais gestações chegaram de fato ao parto. Eles observaram que matrizes sem a presença de corpo lúteo no exame ginecológico preliminar (antes do protocolo hormonal), apresentam taxas de concepção iguais aquelas com corpo lúteo no mesmo momento. A presença, ou não, do corpo lúteo no momento da avaliação preliminar, portanto, não deve ser tratada como determinante. Baseado nisto, é possível aumentar o quantitativo de receptoras destinadas à biotécnica, e assim diluir os custos fixos associados ao programa.

Já Andrade et al. (2012), creditaram o êxito de um programa de TE à minuciosa sincronia entre a receptora e o embrião. Para os autores, é necessário que se façam escolhas

precisas no momento de selecionar o embrião em fase ideal para coincidir com o ambiente uterino da receptora submetida ao protocolo hormonal.

Outro dado importante sobre as receptoras, é a quantidade de vezes que o animal foi utilizado previamente em programas de transferência de embrião, e, claro, o sucesso dessas tentativas. Jelonschek et al. (2018), apontam uma relação inversa entre a eficiência reprodutiva das receptoras e o número de TEs prévias. Ou seja, as receptoras perdem eficiência reprodutiva à medida que são submetidas ao procedimento. Os autores concluem que vacas com histórico de quatro TEs ou mais não deveriam mais ser utilizadas como receptoras. Eles apontam a eventual má higienização do animal, que pode levar à contaminação do útero, como ponto determinante para o possível insucesso do programa.

1.3 Aspiração folicular

A obtenção de oócitos *in vivo* era antigamente realizada por meio de laparotomia, técnica complexa e sujeita à complicações, como, por exemplo, aderências ovarianas. O procedimento moderno, popularmente conhecido como aspiração folicular, é tido como uma técnica relativamente simples, pouco invasiva, de rápida duração e com custos muito inferiores ao da laparotomia (LUEDKE, 2019). Oficialmente, o procedimento é reconhecido pela sigla em inglês OPU, que significa *ovum pick-up*, ou, no português literal, “pegar o óvulo”.

Existe uma diversidade de estudos envolvendo a obtenção de oócitos, que têm como objetivo melhorar a compreensão das etapas de maturação, fertilização, clivagem inicial e cultivo *in vitro* de embriões. Alguns pesquisadores recorrem a matadouros para obter ovários de vacas *post mortem*, como forma de coletar número mais alto de amostras de oócitos, e de maneira mais fácil e rápida (GOTTARDI e MINGOTI, 2009; CROCOMO et al., 2011; CROCOMO et al., 2013).

Duas principais técnicas podem ser utilizadas em ovários obtidos em matadouros – como também em ovários de animais com alto valor genético que vieram a óbito por causas naturais. A primeira é o *slicing* que, como o próprio nome em inglês sugere, resume-se ao fatiamento da porção mais externa do ovário e na coleta, em sequência, do líquido folicular. A segunda é a aspiração folicular realizada por meio de agulha acoplada à seringa ou a uma bomba de vácuo. Esta segunda técnica permite a aspiração mais precisa dos folículos. Santos et al. (2016) compararam as duas técnicas em um experimento, e puderam concluir que a taxa de recuperação oocitária decorrente da técnica de *slicing* foi maior do que aquela obtida pela aspiração. Entretanto, os oócitos oriundos da aspiração possuem qualidade mais alta quando

comparados aos oócitos do *slicing*. A qualidade dos oócitos é critério fundamental quando se tem em vista o desenvolvimento dos embriões.

Partindo para a OPU propriamente dita, antes do procedimento de coleta de oócitos *in vivo* é necessária a higienização da vulva da vaca doadora com água e sabão neutro, e posterior secagem do local, para evitar qualquer contaminação ascendente ao sistema reprodutivo (GOUVEIA, 2011). A fim de impedir movimentos peristálticos que dificultem a manipulação do ovário através do reto, além de eventuais traumas ao animal, realiza-se anestesia epidural, entre a articulação sacro caudal, ou entre a primeira e a segunda vértebras coccígeas, usando lidocaína a 2% sem vaso dilatador, na dosagem de 1 mL por 100 quilogramas de peso vivo (RENESTO, 2004; GIMENES, 2010). Após higienização da vulva e anestesia do animal, coloca-se no fundo de saco da vagina uma guia acoplada ao transdutor. Antigamente, era comum a utilização do transdutor linear, mas com o aprimoramento da técnica notou-se aumento de 10% a 20% no total de oócitos coletados quando utilizados o transdutor microconvexo ou setorial (SENEDA et al., 2004).

Para executar a aspiração folicular é necessária uma bomba de vácuo ligada a um tubo Falcon contendo 5 mL de PBS mais 5,0 UI/mL de heparina. Esta solução tem como objetivo impedir a coagulação do sangue advindo da microcirculação do fundo de saco da vagina (ou do próprio ovário), e deve permanecer aquecida a temperatura de 38 graus Celsius (CRUZ et al., 2009). Acoplado ao tubo Falcon por meio de uma rolha, existe ainda a linha de aspiração que percorre o interior do mandril da guia intravaginal, e faz a ligação com a agulha que punciona os folículos (DYAN, 2001). O vácuo gerado faz com que, a cada punção nos folículos, o líquido se desloque para dentro do tubo, carregando os oócitos de interesse.

Seneda et al. (2004), realizaram comparativo entre as bombas de vácuo utilizadas na aspiração folicular, com intuito de baratear os custos de materiais. A partir dos resultados observados, propuseram o uso de uma bomba de infusão contínua como alternativa viável e eficiente. VIANA e BOLS (2005), por sua vez, alertaram para a necessidade de ajustar cuidadosamente a pressão da bomba de vácuo a fim de evitar comprometer as estruturas dos oócitos coletados e, principalmente, preservar as células do *cumulus oophorus* – essenciais durante o processo de fertilização. A depender da bomba utilizada, a pressão pode variar entre as faixas abaixo:

- de 72 a 78 mmHg, ou vazão de 15mL/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 et al., 2009);
- 60 a 100 mmHg, ou vazão de 10 a 20 mL/minuto (EMBRAPA, 2014).

A aspiração folicular realizada *in vivo* é uma prática cada vez mais difundida no mundo. Entre outras coisas, isso se deve à possibilidade de aplicar a técnica em animais com patologias adquiridas, e não somente em animais saudáveis. Entre as patologias, ou condições, que impediriam a participação do animal em programas de IATF e TE, podemos apontar: aderências de tuba e útero, mucometra, e gestação em curso. Em todos esses casos, a OPU é possível desde que os ovários estejam ativos e que possam ser manipulados (EMBRAPA, 2014).

Não obstante, os grandes avanços desde o início dos anos 2000, a OPU é um procedimento em contínuo processo de aprimoramento e a otimização, principalmente com relação à coleta de oócitos de qualidade superior. Viana e Bols (2005), creditam o sucesso dos programas de PIVE ao número e à qualidade dos complexos cumulus-oócitos (COC's), advindos da OPU. Ramos et al. (2007), realizaram estudo em vacas Gir quanto ao efeito da somatotropina recombinante bovina (rbST), administrada antes da OPU, na qualidade dos oócitos aspirados. Os autores observaram melhora somente quando a rbST foi associada ao hormônio folículo estimulante (FSH). Esse resultado é semelhante ao obtido por Pfeifer et al. (2011), que constataram aumento na qualidade dos ovócitos coletados em vacas submetidas ao protocolo de superovulação com uso de FSH. Baruselli et al. (2019), afirmam que, além do FSH e da rbST, o propilenoglicol e as células tronco são capazes de melhorar a qualidade dos oócitos e, por consequência, melhoram também a conversão desses oócitos em embriões.

1.3 Maturação *in vitro* (MIV)

Após o procedimento de OPU, o conteúdo líquido recuperado dos folículos (que antes estava no tubo Falcon), é transferido para um filtro de coleta de embriões, e em seguida lavado com a mesma solução utilizada na aspiração. A lavagem procede até que esse líquido se torne límpido, de modo a facilitar a visualização dos oócitos no estereomicroscópio (RENESTO, 2004). Para chegar ao estereomicroscópio, o conteúdo é despejado numa placa de Petri, com muito cuidado para não perder os oócitos presos à malha do filtro. Usando uma seringa de 20 mL, aplicam-se jatos daquela mesma solução sobre o fundo do filtro, entornando o conteúdo mais uma vez dentro da mesma placa Petri (DAYAN, 2001). Finalmente, a placa é levada ao estereomicroscópio para localização, lavagem e classificação dos oócitos.

O principal critério de classificação se baseia nas características das células do complexo

cumulus-oócito, e leva em conta a morfologia e a quantidade de camadas. Os oócitos são avaliados como de grau I, grau II, grau III e grau IV, ou desnudos (GOUVEIA, 2011). Tanto a celularidade do cumulus, quanto as junções GAP-comunicante, que se encontram entre o cumulus e os oócitos, desempenham papel fundamental durante o processo de maturação, e, conseqüentemente, na fertilização e no desenvolvimento embrionário (LUEDKE, 2019).

Quanto ao meio de lavagem dos oócitos, autores apontam uma diversidade de métodos possíveis. Renesto (2014), opta por lavar os oócitos 3 vezes e utiliza o TCM-199 Hepes suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 70 µg de amicacina. Já Gimenes (2010), lava os oócitos quatro vezes. Nas duas primeiras, utiliza meio de lavagem H199; e nas duas últimas, usa meio de maturação B199. Antonioli (2005), utiliza TCM modificado composto por TCM-199 acrescido de bicarbonato de sódio, sulfato de gentamicina e tampão HEPES. Dayan (2001), usa apenas o TCM-199 suplementado com 10% de SFB, enquanto a Embrapa (2014), sugere TCM-199 com sais de Hanks, tampão HEPES, antibiótico (penicilina e estreptomicina) e soro fetal bovino.

Depois da lavagem, os oócitos são transferidos para os meios de maturação com objetivo de fornecer um ambiente que deve se assemelhar ao máximo ao líquido folicular. Vários meios de maturação são utilizados em pesquisas, como TCM-199 acrescido de gentamicina, piruvato de sódio, bicarbonato de sódio (ANTONIOLLI, 2005); e TCM-199 suplementado com glutamina, antibiótico, bicarbonato de sódio, piruvato de sódio, FSH, LH, estradiol e soro fetal bovino (EMBRAPA, 2014). Importante pontuar que o tampão HEPES adicionado aos meios de lavagem e maturação tem a função de minimizar a variação de pH e fornecer ao oócito meio mais propício ao seu desenvolvimento (MONTAGNER et al., 2000).

Em estudo, com objetivo de baratear os custos da PIVE, Figueiró et al. (2004), constataram que o soro de éguas em estro pode substituir a adição do LH e do FSH durante o processo de maturação. Os autores não observaram o mesmo uso para o soro de vacas em estro.

Para transporte dos oócitos, geralmente se adicionam gases aos oócitos envasados em tubos. Porém Leivas et al. (2004), chegaram à conclusão de que os oócitos bovinos em meio de maturação TCM+HEPES a 39 °C e sem controle de atmosfera gasosa podem ser deslocados por até 12 horas sem ter suas estruturas comprometidas em qualquer medida.

A maturação do oócito compreende diversas reações complexas: transformações nucleares, citoplasmáticas e moleculares. Citamos ainda a interação e a regulação recíprocas entre oócito e células foliculares responsáveis pela criação do ambiente necessário à capacitação do oócito. Os mecanismos exatos dessas reações complexas, no entanto, não estão completamente elucidados. Isso acaba interferindo na eficiência da PIVE na medida em que o

ambiente *in vitro* pode não proporcionar as competências necessárias para que os oócitos desenvolvam um embrião viável (GOTTARDI E MINGOTI, 2009). O que sabemos ao certo é que para a maturação ocorrer e os oócitos migrarem do estágio de diplóteno da prófase I (primeira divisão meiótica), para o estágio de metáfase II (segunda divisão meiótica), são necessárias de 18 a 22 horas (LUEDKE et al., 2019). Só depois disso é que os oócitos se tornam aptos à fertilização.

1.4 Fertilização *in vitro* (FIV)

A grande maioria das técnicas de FIV utilizam sêmen congelado, de modo que a dose permanece estocada no laboratório e está prontamente à disposição quando necessária. No que se refere à concentração recomendada para a FIV (2 milhões de espermatozoides por mililitro), o congelamento do material otimiza o uso do sêmen (GIMENES, 2010).

Antes do procedimento de FIV propriamente dito é preciso descongelar a palheta de sêmen e submetê-lo a um processo de seleção dos espermatozoides móveis e remoção do diluidor e/ou do plasma seminal – além da separação de células não espermáticas (LIMA, 2018). Esse processo (ou sequência de processos), pode ser realizado utilizando uma de três técnicas: lavado espermático, “*swim-up*”, ou – a mais comumente utilizada – o gradiente de Percoll (EMBRAPA, 2014).

A técnica do Percoll consiste, no primeiro momento, em criar uma solução de concentração gradual, em que a densidade aumenta partindo da camada superior para a inferior. O sêmen é colocado no topo da solução, e depois centrifugado. Os espermatozoides vivos são obrigados a percorrer as camadas da solução por causa da força centrífuga exercida sobre eles. Assim obtemos um *pellet* contendo os espermatozoides selecionados no fundo do ependorf (RENESTO, 2004).

Já o “*swim-up*” possui metodologia reversa quando comparada ao gradiente Percoll. A amostra seminal é depositada no fundo de um tubo previamente aquecido contendo Sperm-TALP, e os espermatozoides móveis migram até a superfície (ANTONIOLLI, 2005).

Após a seleção espermática, chega o momento de depositar os gametas numa placa, com meio adequado para capacitação dos espermatozoides, e conseqüente fertilização do oócito. *In vitro*, o processo de capacitação dos espermatozoides é iniciado por glicosaminoglicanas presentes no meio de fecundação, tornando-os aptos a se ligarem aos receptores da zona pelúcida. Esta ligação é que promove a liberação do conteúdo acrossômico e conseqüente fusão da membrana vitelínica, desencadeando a liberação dos grânulos corticais e o bloqueio da

poliespermia (EMBRAPA, 2014).

Diversos meios e metodologias são utilizadas com intuito de aumentar as taxas de fertilização e desenvolvimento de embriões que resultem em gestação. Os meios mais comumente empregados são dois: TALP ou TL. Os meios são suplementados com antibióticos (gentamicina ou penicilina), albumina sérica bovina (GIMENES, 2010), piruvato (LIMA, 2018), hipotaurina, epinefrina e heparina (ANTONIOELLI, 2005; RENESTO, 2004; DAYAN, 2001).

Assim como no transporte de oócitos, na FIV pode-se trabalhar tranquilamente com diferentes atmosferas gasosas. Santos et al. (2018), realizaram pesquisa comparativa expondo os oócitos a diferentes tensões de oxigênio, e puderam concluir que níveis baixos de oxigênio não interferem na taxa de produção *in vitro* de embriões.

Estudos ainda vêm sendo realizados com intuito de baratear e otimizar os meios destinados à FIV. Gilardi et al. (2004), observaram diferentes impactos do soro fetal bovino na técnica de FIV, como a diminuição da taxa de clivagem inicial e o aumento do desenvolvimento embrionário consecutivo. No mesmo trabalho, a utilização da albumina sérica bovina possibilitou melhora na clivagem dos embriões, resultado que foi corroborado por Gimenes (2010) e Antonioli (2005).

1.5 Cultivo dos embriões *in vitro* (CIV)

A fase de cultivo *in vitro*, baseia-se em fornecer ambiente adequado ao desenvolvimento embrionário, e fazer o acompanhamento das fases deste desenvolvimento. Várias mudanças importantes acontecem com o embrião durante esse período, como a clivagem, a ativação do genoma embrionário, a compactação dos blastômeros, a diferenciação do trofoblasto e do embrioblasto, a formação e a expansão da blastocela, e o rompimento da zona pelúcida (EMBRAPA, 2014).

Os meios de cultivo diferem dos meios de FIV, tendo em vista que estes últimos proporcionam um ambiente para capacitação e manutenção dos espermatozoides, enquanto o primeiro, visa à nutrição e à divisão celular dos embriões. Após a FIV, as estruturas são transferidas para outra placa e, com auxílio da pipeta e da hialuronidase, retiram-se as células do cumulus, deixando os prováveis zigotos desnudos (GIMENES, 2010).

No que se refere ao meio de cultivo utilizado, é possível aplicar diferentes metodologias. O mesmo vale para a frequência do “*feeding*”, que pode ser definido como a troca (ou renovação) do meio, com objetivo de manter os embriões sempre nutridos.

O meio mais utilizado para o cultivo é o SOF (fluidos sintéticos do oviduto), em que as variações acontecem nas substâncias adicionadas a ele, como aminoácidos essenciais (LIMA, 2018) e a gentamicina (ANTONIOLLI, 2005). Mas, outros meios também podem ser empregados, como o CR2 suplementado com soro fetal bovino (DAYAN, 2001). A Embrapa (2014), recomenda o SOF com adição de SFB, albumina sérica bovina (BSA), aminoácidos, piruvato, lactato e glutamina.

Com relação à frequência de adição do meio de cultivo, Renesto (2004), realizou a adição no terceiro e quinto dias após a fertilização, enquanto Dayan (2001), e a Embrapa (2014), recomendam um único *feeding* após 48 horas da FIV. No momento da troca ou da adição do meio de cultivo, aproveita-se também para analisar o desenvolvimento embrionário e sua taxa de clivagem, ou seja, quantos embriões atingiram estágio de mórula, blastocisto ou não evoluíram (DAYAN, 2001).

1.6 Transferência de embrião (TE)

A transferência de embrião diz respeito à última etapa de um programa de produção *in vitro* de embrião. O procedimento se inicia na contenção do animal; segue-se à anestesia epidural baixa com lidocaína a 2%, a fim de melhorar a manipulação do útero através do reto; e, na sequência, a higienização da vulva para evitar contaminações (DAYAN, 2001). O inovulador é introduzido na vagina, passa-se a cérvix e então o embrião é depositado profundamente no útero, no corno ipsilateral ao ovário com corpo lúteo (FILHO, 2018).

Para obter boas taxas de implantação embrionária é necessário que as receptoras estejam submetidas a boas condições de manejo. Conforme exposto em seção anterior deste trabalho, nutrição, sanidade e bem-estar são exemplos de fatores que podem interferir na gestação (DEMCZUK, 1998), tendo em vista que os embriões produzidos *in vitro* são mais suscetíveis ao estresse e a variações no meio (ANDRADE et al., 2012).

A sincronia do estágio do embrião com a fase do ciclo estral da vaca também é de suma importância. As melhores taxas de gestação são observadas entre o oitavo e décimo dia, a partir do fim do protocolo hormonal. Nesse período, o corpo lúteo já se encontra ativo e o útero pronto para conceber (DAYAN, 2001; FILHO, 2018).

Considerações finais

A ascensão da pecuária brasileira se deve a diversos fatores, entre os quais está o desenvolvimento técnico-científico da medicina veterinária, com destaque para a área da reprodução animal. A produção *in vitro* de embriões permite otimizar o uso do sêmen sexado e melhorar o aproveitamento das fêmeas. Por isso, a PIVE em bovinos foi responsável por parte significativa do avanço da pecuária brasileira no cenário mundial.

O sucesso da técnica de PIVE está ligado a diversos fatores que interferem em cada uma das etapas do processo. Para que se obtenha êxito nos programas de melhoramento genético, é preciso, por exemplo, numa fase mais inicial, minimizar os danos e estresses que acometem os oócitos. Em fase posterior, durante o cultivo do embrião, o desafio envolve a criação de um ambiente favorável ao desenvolvimento do embrião.

Não obstante, os avanços da biotecnologia desde a chegada da PIVE ao Brasil, ainda se fazem necessários mais estudos, a fim de melhorar a qualidade dos oócitos captados por meio da OPU; de elucidar os processos da maturação; e de otimizar o uso das receptoras. Tudo isso com objetivo de elevar as taxas de diagnóstico gestacional positivo.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE G.A. *et al.* 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, março, 2012.
- ANTONIOLLI, C. B. A. **Produção In Vitro de Embriões Bovinos Utilizando Diferentes Condições de Maturação**. Porto Alegre, 2005, 30p, Tese (Mestrado em Reprodução Animal) Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- BARUSELLI, P. S. *et al.* Estratégias para aumentar a produção de embriões em bovinos. **XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**. Gramado, maio, 2019.
- BECHER, B. G. *et al.* 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 PECUARIA DO BRASIL. **Comunicado Técnico: PIB Brasil**. edição 17/2021.
- CROCOMO, L. F. *et al.* Aspectos bioquímicos e ultraestruturais da maturação oocitária. **Veterinária e Zootecnia**. v. 18, n. 4, p. 542-552, dezembro, 2011.
- CROCOMO L. F. *et al.* Aspectos ultraestruturais dos complexos cumulus-oócito de mamíferos domésticos. **Veterinária e Zootecnia**. v. 20, n. 2, p. 171-182, junho, 2013.
- CRUZ, F. B. *et al.* Aspiração folicular em vacas *Bos 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. M. **Recuperação de Oócitos em Doadoras Gir e Girolando**. Morrinhos, 2019, 29p. Trabalho de Conclusão de Curso. IFG.
- DANTAS, K. S. A. *et al.* 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, 2001, 56p, Tese (Mestrado em Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista.
- DEMCZUK, E. *et al.* Transferência de embrião em vacas da raça Simental na região noroeste do Paraná e Sul do Mato Grosso do Sul. **Jornal Brasileiro 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, 1ª edição, outubro, 2014.
- FIGUEIRÓ, G. M. *et al.* 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, abril, p. 479-484, 2004.

FILHO, G. N. B. **Taxa de Concepção e Gestação de Embriões Produzidos In Vitro, Transferidos a Fresco ou Criopreservado, em Vacas e Novilhas Nelore.** São Paulo, 2018, 33p, Tese (Mestrado em Reprodução Animal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo

GILARDI, S. G. T. *et al.* Efeito de diferentes meios de cultivo no desenvolvimento e proporção do sexo de embriões bovinos produzidos in vitro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** Belo Horizonte, v. 56, n. 5, p. 623-627, outubro, 2004.

GIMENES, L. U. **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, 2010, 122p, Tese (Doutorado em Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

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

GUIMARÃES, A. S. B. *et al.* In vitro performance of Zebu (*Bos indicus*) and Taurus (*Bos taurus*) donor cow embryos. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal.** v. 21, p. 1-11, julho, 2020.

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

GOTTARDI, F. P. e MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.** Belo Horizonte, v. 33, n. 2, p. 82-94, junho, 2009.

HONORATO, M.T. *et al.* Importância da escolha de receptoras em um programa de transferência de embriões em bovinos. **PUBVET,** Londrina, v. 7, n. 19, Ed. 242, Art. 1601, Outubro, 2013.

IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal.** 2019.

JELONSCHEK, J. P. *et al.* Fatores que afetam a taxa de gestação de receptoras de embriões produzidos in vitro. **Scientific Electronic Archives.** v. 11, n. 6, p. 173-179, dezembro, 2018.

LEIVAS, G. F. *et al.* Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa. **Ciência Rural.** Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 219-224, fevereiro, 2004.

LIMA, C. B. **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, 2018, 117p, Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

LUEDKE, F. E. *et al.* 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. Abri, 2020.

- MELLO, R. R. C. *et al.* Produção in vitro (PIV) de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 40, n. 2, p. 58-64. Junho, 2016.
- MONTAGNER, M. M. *et al.* Hepes na produção de embriões bovinos in vitro. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 30, n. 3, p.469-474, junho, 2000.
- PFEIFER, L. F. M. *et al.* 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, setembro, 2011.
- PELLEGRINO, C. A. G. **Avaliação Econômica da Produção In Vitro de Embriões Bovinos de Diferentes Grupos Genéticos em Sistema Comercial**. Belo Horizonte, 2013, 127p, Tese (Doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.
- PEREIRA, J. F. S. *et al.* Recuperação de oócitos em bovinos da raça Guzerá e Holandesa. **Revista Eletrônica Biociências, Biotecnologia e Saúde**. Curitiba, n. 19, dezembro, 2017.
- PINHO, G. A. S. **Índices de Recuperação de Oócitos e Produção de Embriões por Fecundação In Vitro nas Raças Gir Leiteiro, Holandês E Girolando**. Gramma, 2019, 16p., Trabalho de Conclusão de Curso. UNICEPLAC.
- RAMOS, A. A. *et al.* 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, abril, 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, 2004, 59p, Tese (Mestrado em Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista.
- RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 36, suplemento especial, p. 229-233, 2007.
- SANTOS, M. V. O. *et al.* Influência do Método de Recuperação Oocitária sobre os Parâmetros Quanti-Qualitativos de Oócitos Bovinos. **Ars Veterinária**. Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 105-109, maio, 2016.
- SANTOS, M. *et al.* Cultivo de embriões bovinos em diferentes tensões de oxigênio. **28o Congresso Brasileiro de Zootecnia**. Goiânia, agosto, 2018.
- SENEDA, M. M. *et al.* 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.
- SOUZA, N. S. e ABADE, C. C. Produção In Vitro de Embriões Bovinos: Etapas de Produção e Histórico no Brasil. **Ciência Veterinária UniFil**. v. 1, n. 3, setembro, 2018.

VIANA, J. H. M., FIGUEIREDO, A. C. S., SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and exceptions for the future. **Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society**. Cabo de Santo Agostinho, agosto, 2017.

VIANA, J. H. M. e FIGUEIREDO, A. C. S. Produção de embriões bovinos em 2014 e 2015: reflexos de um período de turbulências. **Jornal O Embrião**. Foz do Iguaçu, 2o semestre 2016, edição 58, p. 6-10.

VIANA, J.H.M. e BOLS, P.E.J. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus-oócito por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.33, n. 1, p.1-4, 2005.