

**INSTITUTO FEDERAL**  
**GOIANO**  
Câmpus Rio Verde

**CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA**

**BIOTECNOLOGIA NA REPRODUÇÃO ANIMAL: UMA  
VISÃO TEÓRICO/PRÁTICA DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE  
EMBRIÕES BOVINOS**

**ANA CAROLINA ALVES DA GUARDA**

**AGOSTO- GO  
2023**

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA GOIANO - CÂMPUS RIO VERDE**

**CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA**

**BIOTECNOLOGIA NA REPRODUÇÃO ANIMAL: UMA  
VISÃO TEÓRICO/PRÁTICA DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE  
EMBRIÕES BOVINOS**

**ANA CAROLINA ALVES DA GUARDA**

Trabalho de Conclusão de curso  
apresentado ao Instituto Federal Goiano –  
Câmpus Rio Verde, como requisito parcial  
para a obtenção do Grau de Bacharel em  
Zootecnia.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Paula Cardoso  
Gomide

Rio Verde - GO  
Agosto, 2023

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP  
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano**

Guarda, Ana Carolina Alves  
GB616b BIOTECNOLOGIA NA REPRODUÇÃO ANIMAL: UMA VISÃO  
TEÓRICO/PRÁTICA DE PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES  
BOVINOS / Ana Carolina Alves Guarda; orientadora Ana  
Paula Cardoso Gomide . -- Rio Verde, 2023.  
28 p.

TCC (Graduação em Bacharelado em Zootecnia) --  
Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2023.

1. Biotecnologia. 2. Produção in vitro. 3.  
Embriões. 4. Reprodução. 5. Oócitos. I. Cardoso  
Gomide, Ana Paula, orient. II. Título.

## TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

### IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- Tese (doutorado)  Artigo científico  
 Dissertação (mestrado)  Capítulo de livro  
 Monografia (especialização)  Livro  
 TCC (graduação)  Trabalho apresentado em evento

Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:

Matrícula:

Título do trabalho:

### RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial:  Não  Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano:  /  /

O documento está sujeito a registro de patente?  Sim  Não

O documento pode vir a ser publicado como livro?  Sim  Não

### DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;

- Que obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;

- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde

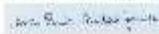
15 / 08 / 2023

Local

Data

  
Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

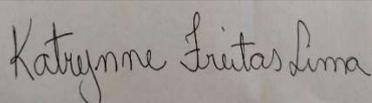
Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)

**ANA CAROLINA ALVES DA GUARDA**

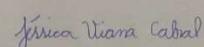
**BIOTECNOLOGIA NA REPRODUÇÃO ANIMAL: UMA VISÃO  
TEÓRICA/PRÁTICA DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES  
BOVINOS**

Trabalho de Curso DEFENDIDO e APROVADO em 11 de agosto de 2023, pela Banca Examinadora constituída pelos membros:



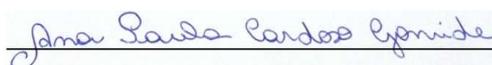
---

Katrynne Freitas Lima  
Zootecnista  
Instituto Federal Goiano  
Campus Rio Verde – GO



---

Jéssica Viana Cabral  
Zootecnista  
Instituto Federal Goiano  
Campus Rio Verde – GO



Ana Paula Cardoso Gomide  
IF Goiano - Campus Rio Verde  
Matricula: 2143967

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Cardoso Gomide  
Instituto Federal Goiano  
Campus Rio Verde - GO

Rio Verde - GO  
Agosto, 2023

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela proteção, sabedoria, paciência e saúde. Agradeço também a minha filha Ana Laura Alves Carneiro pela paciência e compreensão, fui ausente durante esse período da graduação, pois tive que dedicar aos estudos na instituição de ensino superior e nos estágios. Gratidão, por sempre me apoiar, pelo carinho e compreensão durante essa jornada.

A minha mãe Ana Lucia Alves Ferreira da Guarda, sem você nada disso teria concretizado. Obrigada mãe, por todo amor, carinho, dedicação e esforço. Ao meu pai Wilson José da Guarda (*in memorian*), por me ensinar a ver a vida de uma forma mais leve, feliz e com muita intensidade. Ao meu avô Justiniano Alves Silva (*in memorian*), que sempre fez tudo, exatamente tudo para me ver feliz. Em vida vocês me apoiaram, me amaram e permaneceram ao meu lado, sempre me dando força e incentivando a seguir meus sonhos e realizar meus objetivos.

Aos meus tios, Lucelio Alves Ferreira e Luceni Alves Ferreira e minha avó Margarida Ferreira da Silva que junto de meus pais me apoiaram e amaram. Agradeço as minhas primas, Juliana Alves da Guarda, Jordana Alves da Guarda, Tatiane Alves da Guarda, Natane Guilhermina da Guarda, Nayara Alves Ferreira e Nayane Alves Ferreira, por toda ajuda, carinho, amor e preocupação.

As minhas amigas Anna Beatriz Borges Carvalho, Luana Almeida Cortina e Julia Lorraine Barbosa Burgo, que sempre estiveram comigo durante minha vida e trajetória acadêmica, sempre acreditaram em mim, me deram forças, carinho e amor. Durante a minha jornada acadêmica pude conhecer e fazer amigas que levarei para o resto da minha vida. Agradeço a Yara Carolina Santana, Anna Clara Barbosa, Isadora Rissato, Katrynne Freitas, Samylla Murielle, Ana Cláudia Duarte, vocês estiveram ao meu lado em todos os momentos difíceis da minha vida, e até hoje são presentes independente da distância.

A minha orientadora Ana Paula Cardoso Gomide, agradeço por não desistir de mim, obrigada pelos conselhos, por sempre me atender e me escutar nos meus momentos difíceis.

Agradeço a todos aqueles que estão presentes na minha vida, me incentivando a continuar e não desistir. Enfim, será mais um sonho realizado, e percebi o quanto fui guerreira para concluir o ensino superior. Foram anos felizes e ao mesmo tempo difíceis, cada momento foi dedicado com muita intensidade, fui forte em momentos que jamais imaginaria ser, mas venci!

## RESUMO

GUARDA, Ana Carolina Alves. **Biotecnologia na reprodução animal: Uma visão teórico/prática de produção *in vitro* de embriões bovino.** 2023. 28p. Trabalho de Conclusão de curso (Bacharelado de Zootecnia). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde, Rio Verde, GO, 2023.

A pecuária brasileira está em constante desenvolvimento, paralelamente as biotecnologias da reprodução e sua aplicação comercial tem se expandido. Biotecnologias vem sendo usadas para maximizar a produtividade e eficiência reprodutiva, aumentando a produção de animais geneticamente superiores, obtendo assim maior número de descendentes geneticamente superiores em um curto período de tempo. Dentre as técnicas atuais, destaca-se a Produção *in vitro* de embriões bovinos (PIV), o processo da produção *in vitro* de embriões envolve etapas que incluem a obtenção dos oócitos, maturação, fecundação e o cultivo. Que juntamente com as demais biotécnicas da reprodução, foram responsáveis pela grande expansão da pecuária brasileira, reduzindo o intervalo entre gerações e selecionando cada vez mais as reprodutoras.

**Palavras-chave:** biotecnologia, produção *in vitro*, embriões, reprodução, oócitos.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Maturação Nuclear.....	11
Figura 2 – Desenvolvimento embrionário e morfológico.....	13
Figura 3 – Avaliação morfológica do embrião até o 6º dia.....	14
Figura 4 – Incubadora de Laboratório de CO2.....	17
Figura 5 – Transportadora de oócitos e embriões (TED) .....	18
Figura 6 – Seleção dos blastocistos.....	21
Figura 7 – Palhetas de envase.....	22
Figura 8 – Mesa com equipamentos para vitrificação.....	23
Figura 9 – Congelamento de embriões.....	24
Figura 10 – Máquina de congelar embriões TK-1000®.....	24

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>9</b>
<b>2.1</b>	<b>Produção In Vitro de Embriões (PIVE) bovinos</b> .....	<b>9</b>
<b>2.2</b>	<b>Aspiração folicular guiada por ultrassonografia (Ovum Pick-up OPU)</b> .....	<b>9</b>
<b>2.3</b>	<b>MATURAÇÃO <i>in vitro</i> de oócitos (MIV)</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4</b>	<b>Fecundação <i>in vitro</i> de embriões bovinos (FIV)</b> .....	<b>12</b>
<b>2.5</b>	<b>Cultivo <i>in vitro</i> de embriões (CIV)</b> .....	<b>12</b>
<b>2.6</b>	<b>Congelamento de embriões</b> .....	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>ATIVIDADES DESENVOLVIDAS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Limpeza, Manutenção e Esterilização</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2</b>	<b>Preparação de tubo de MIV (Maturação <i>in vitro</i>) e meio de lavagem</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3</b>	<b>Coleta e recepção de oócitos</b> .....	<b>18</b>
<b>3.4</b>	<b>FIV (Fertilização <i>in vitro</i>) (D0)</b> .....	<b>19</b>
<b>3.5</b>	<b>Cultivo <i>in vitro</i> (CIV) (D1)</b> .....	<b>20</b>
<b>3.6</b>	<b>Clivagem (CIV) (D5)</b> .....	<b>20</b>
<b>3.7</b>	<b>Previsão (D6)</b> .....	<b>20</b>
<b>3.8</b>	<b>DIA 07 (D7)</b> .....	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>28</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente na pecuária nacional, a evolução da produtividade está associada as evoluções científicas e tecnológicas. A biotecnologia usada na reprodução animal vem sendo desenvolvida e aprimorada, visando aumentar a eficiência reprodutiva, aumentando a produção de animais geneticamente superiores, obtendo maior número de descendentes em um curto período de tempo (RENESTRO, 2004).

A aplicação das técnicas de reprodução animal consiste em potencializar a eficiência reprodutiva animal, e viabilizar a fertilidade, facilitando o encontro entre gametas feminino e masculino para que ocorra a fertilização no animal – *in vivo*, como em laboratório – *in vitro* (SALVADOR, 2019).

O Brasil é uma das referências mundiais em produção de embriões *in vitro*, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o país ingressou nas pesquisas em 1990 e despontou nos anos de 2012 e 2013. Em 2017, conseguimos a segunda posição mundial na produção global de embriões bovinos (SEBRAE, 2022). Em 2019 ocorreram transformações significativas na indústria de embriões no Brasil, esse período marcou os 20 anos dos primeiros registros de transferência de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Houve mudança significativa não só em números, mas também na dinâmica do mercado de produtos e serviços relacionados, valores econômicos e margens de lucro (GONÇALVES; VIANA, 2019).

Segundo Vieira (2012, p. 156):

A biotecnologia é uma forte ferramenta para a indústria pecuária. Várias técnicas como a inseminação artificial, criopreservação de gametas e embriões; superovulação e transferência de embriões; sexagem espermática e embrionária, Recuperação de oócitos e a fertilização *in vitro*; clonagem por transferência nuclear de células embrionárias ou somáticas, transgenia e a biologia de células tronco, têm promovido o desenvolvimento científico e tecnológico em todo mundo, tornando o Brasil uma referência na produção *in vitro* de embriões.

No cenário atual da pecuária as técnicas de biotecnologia mais utilizadas são a inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões. A definição do termo inseminação artificial (IA) implica a deposição de espermatozoides no trato reprodutivo feminino por meios artificiais, em vez do serviço natural envolvendo diretamente o macho (BARBOSA; MACHADO, 2008). O sêmen é depositado no aparelho reprodutivo da fêmea; a fecundação, ou seja, a união do espermatozoide com o óvulo e a formação de um novo ser ocorrem naturalmente (ASBIA, 2022).

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF), é considerada uma grande ferramenta devido a possibilidade de inseminar uma grande quantidade de animais, em um período determinado de tempo, sem a necessidade de observação de cio. O uso da IATF também permite a indução da ciclicidade em vacas em anestro, diminuição do intervalo de partos, aumento dos números de bezerros nascidos e sincronização dos cios de retorno das fêmeas falhas (GODOI; SILVA; PAULA, 2010).

A Transferência de Embriões (TE) é uma biotecnologia que permite recolher embriões de uma fêmea doadora e transferi-los para fêmeas receptoras com a finalidade de completarem o período de gestação (PASA, 2008).

Já a produção in vitro de embriões (PIVE) é uma técnica de reprodução assistida que consiste na preparação e cultivo de gametas em ambiente laboratorial para geração do zigoto, e seu cultivo até o estágio de desenvolvimento embrionário desejado. Está relacionada a uma série de procedimentos integrados, que vão desde o manejo reprodutivo das doadoras e receptoras, punção folicular guiada por ultrassom, procedimentos no laboratório até a transferência dos embriões (OLIVEIRA; SARAPIÃO; QUINTÃO, 2014). O domínio do método in vitro de produção de embriões colocou o Brasil em uma posição de destaque neste setor, despertando o interesse de outros países (PELLEGRINO, 2013).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Produção In Vitro de Embriões (PIVE) Bovinos

A produção in vitro (PIV) de embriões é uma importante biotécnica reprodutiva que permite a interação entre o espermatozoide e o oócito fora do trato reprodutivo da fêmea, com a formação de um novo indivíduo (MELLO *et al.*, 2016).

A PIV vem sendo incorporada à reprodução animal, e sua utilização comercial cada vez mais acessível, tornando-se possível a recuperação de ovócitos de fêmeas vivas para a fertilização in vitro (FIV) (SILVA, *et al.*, 2015).

A técnica envolve as etapas de coleta, maturação, fecundação e cultivo in vitro sendo que a eficiência das etapas de maturação e fecundação in vitro não difere daquela obtida in vivo (MELLO, *et al.*, 2016).

### 2.2 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia (Ovum Pick-up - OPU)

Atualmente, utiliza-se a aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU), que é responsável pelo aproveitamento do material genético da fêmea. Essa técnica possui a vantagem de poder ser realizada em qualquer fase do ciclo estral e não interferir no estado fisiológico do animal (SILVA, *et al.*, 2021).

As fêmeas doadoras selecionadas para participar da PIV, devem apresentar um quadro nutricional adequado e serem geneticamente superiores. Não podem apresentar defeitos anatômicos, patologia e etiologia genética, distúrbios reprodutivos e devem apresentar ciclos estrais regulares (OLIVEIRA; SARAPIÃO; QUINTÃO, 2014).

A aspiração folicular transvaginal orientada por ultrassonografia ou OPU (Ovum Pick Up) é a técnica de eleição para a obtenção de oócitos de doadoras vivas, em bovinos, destinados à produção in vitro de embriões (PIV) (OLIVEIRA; SARAPIÃO; QUINTÃO, 2014).

A coleta de oócitos em fêmeas bovinas é realizada pela punção folicular com uma agulha acoplada a uma sonda transvaginal, de forma que os folículos a serem puncionados são observados na tela do ultrassom (SOUZA; ABADE, 2018).

Os oócitos utilizados são aspirados de folículos com diâmetro entre 2 a 8 mm, folículos menores não apresentam competência para desenvolvimento, enquanto os maiores de 8 mm encontram-se em atresia ou já iniciaram o processo de maturação, tornando-se inviáveis para a FIV (MARIANO *et al.*, 2015).

No laboratório de embriões são preparados tubos de maturação para que os oócitos coletados da aspiração sejam armazenados. Nos tubos contem óleo mineral, meio de maturação, infundidos com mistura gasosa composta de 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>. Depois vedados com rolha de silicone. Os tubos seguem para o laboratório em transportados de embriões (TED), com temperatura controlada (+/-36°C). Ao chegar, são armazenados sem tampa nas incubadoras de MIV, em atmosfera controlada à 38,5°C, 5 % CO<sub>2</sub> e umidade saturada, permanecendo até que se complete o período de maturação. Este é finalizado após 24 horas da OPU, quando o oócito finalmente está apto a ser fecundado pelo espermatozoide (SOUZA, 2021).

Os oócitos são classificados em I, II, III e IV, de acordo com a quantidade de células *cumulus*. Oócitos com citoplasma regular e com mais de três camadas de células *cumulus* compactas, se classifica como grau I. Oócito apresentando citoplasma regular ou com algumas granulações finas e com uma a três camadas de células *cumulus*, considera se grau II. Grau III são oócitos desnudos, apresenta menos de três ou apenas uma camada de célula *cumulus*. Grau IV são oócitos desnudos, não apresenta células *cumulus*.

Os oócitos de Grau I, II e III são considerados viáveis para serem encaminhados para maturação (SOUZA, 2021).

### **2.3 MATURAÇÃO *in vitro* de oócitos (MIV)**

A maturação é necessária para que o oócito adquira a capacidade de ser fecundado posteriormente. Para que a fecundação ocorra o oócito deve se desenvolver até o estágio de blastocisto, sofrendo diversas transformações tanto em seu citoplasma quanto em seu núcleo (PENITENTE FILHO, OLIVEIRA; TORRES, 2011).

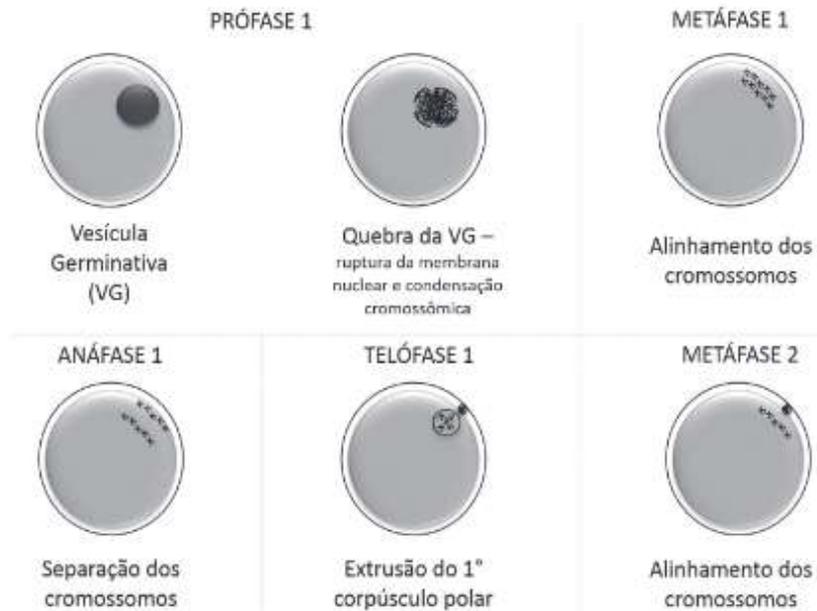
A partir do momento em que o oócito é retirado do contato com as células foliculares o processo de maturação nuclear se dá início. A maturação nuclear do oócito compreende a progressão do estágio diplóteno da primeira prófase meiótica até a fase de metáfase II (MII). O período de maturação varia de 18 a 24 horas em atmosfera controlada contendo 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade saturada (PENITENTE FILHO, OLIVEIRA; TORRES, 2011).

Desta forma, nota-se que a maturação nuclear do oócito é marcada pela progressão do estágio diplóteno, desde a prófase meiótica I, até a fase metáfase II. A figura a seguir apresenta as etapas de maturação nuclear descrita pelos autores.

A primeira modificação do núcleo é a condensação da cromatina e a dissolução da membrana nuclear, processo de ruptura da vesícula germinativa (SILVA, *et al.*, 2017).

Logo após o tempo de incubação da MIV, os oócitos completam a maturação com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e estão prontos para a fecundação (SOUZA; ABADE, 2018).

**Figura 1 – Maturação Nuclear**



Fonte: Oliveira; Sarapião; Quintão (2014, p. 33).

Durante a maturação, os oócitos passam por várias alterações nucleares e citoplasmáticas. Os eventos nucleares incluem: quebra da vesícula germinativa (GBVD), desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico (GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

Os oócitos foram transferidos para o meio de maturação, constituído pelo Meio (Sigma, M4530) suplementado com 10% de SFB, 5,0µg/mL de LH (Lutropin-v, Vetrepharm), 0,5µg/mL de FSH (Folltropin-v, Vetrepharm), 0,2µM de piruvato e 50µg/mL de gentamicina. Os oócitos foram cultivados separadamente na presença de quercetina (0,4, 2, 10 e 50µM), cisteamina (100µM) e na ausência dos antioxidantes (controle) durante 22 horas, em gotas de 100µL de meio de maturação sob óleo mineral, montadas em placa de Petri, a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. (GUEMRA *et al.*, 2013, p. 1618).

## 2.4 Fecundação *in vitro* de embriões bovinos (FIV)

A fecundação *in vitro* ocorre através da incubação de oócitos maduros com espermatozoides capacitados, em meio de fecundação. Ocorrendo a combinação do material genético dos gametas e a formação do zigoto (OLIVEIRA; SARAPIÃO; QUINTÃO, 2014). Após a maturação os oócitos, são lavados em uma gota contendo meio TL e outra contendo meio FIV em seguida transferidos para uma placa Petri de 35mm contendo 5 microgotas de 100  $\mu\text{L}$  de meio de fecundação cobertas com óleo mineral (SILVA, *et al.*, 2017). O meio FIV é composto por o meio Tyrode modificado (TALP) acrescido de soluções de Penicilamida, Hipotaurina e Epinefrina (PHE) e 10 $\mu\text{g/ml}$  de heparina. Os gametas permaneceram incubados em microgotas recobertas com óleo mineral, por 18-20 horas a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar (DAYAN, 2001).

O sêmen proveniente de palhetas de congeladas, passa por uma separação após a descongelação, a fim de se utilizar somente espermatozoides viáveis. Os métodos de separação espermática mais utilizados são o gradiente de PERCOLL e o swim-up. O swim-up é baseado na mobilidade dos espermatozoides móveis migrarem do sedimento formado após centrifugação para um meio de cultura enriquecido sobreposto aos mesmos (SOUZA; ABADE, 2018).

O Percoll é composto de partículas de sílica coloidal (15-30 nm de diâmetro) coberto com polivinilpirrolidona (PVP), preparado em diferentes concentrações para formar um gradiente necessário de separação espermática. Em geral é preparada uma solução de Percoll 90% e 45%, sendo o conteúdo de uma palheta de sêmen descongelado e depositado sob este gradiente em seguida centrifugado e o pellet utilizado para a inseminação *in vitro* (MACHADO, 2009, p. 15).

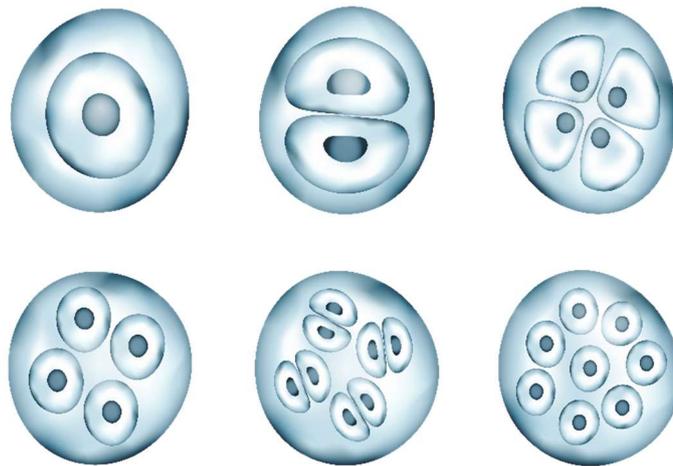
Após a separação, os espermatozoides são diluídos a uma concentração final de 1 a 5 x 10<sup>6</sup> espermatozoides viáveis/ml de meio (PENITENTE FILHO, OLIVEIRA; TORRES, 2011), calculada de acordo com a motilidade e concentração da fração viva de espermatozoides obtida após a centrifugação em gradiente Percoll (SOUZA; ABADE, 2018).

## 2.5 Cultivo *in vitro* de embriões (CIV)

A CIV é o período de desenvolvimento do oócito fertilizado até o estágio de blastócito, consiste em fases importantes como a ativação do genoma embrionário, distinção embrionária,

compactação dos blastômeros, formação e expansão do blastocele e o rompimento da zona pelúcida (SOUZA; ABADE, 2018).

**Figura 2 – Desenvolvimento embrionário e morfológico**



Fonte: Projeto Alfa (2021)<sup>1</sup>

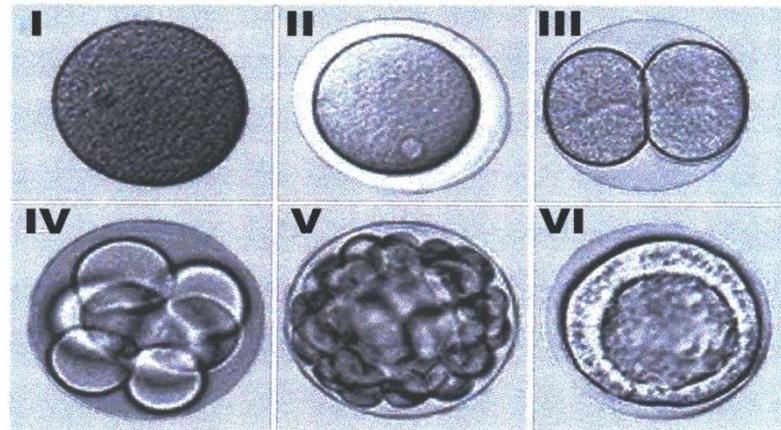
O cultivo embrionário *in vitro* requer um ambiente adequado, com tempo, atmosfera e temperatura (39°C) controlados (5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>). O tempo de cultivo *in vitro* tem apresentado variação de 7 a 9 dias, dependendo do objetivo da rotina de PIV (MELLO, *et al.*, 2016).

Após 24 horas da fecundação *in vitro*, os oócitos são desnudados com auxílio de uma pipeta e transferidos para o meio de cultivo *in vitro* (CIV), um meio comum utilizado pelos laboratórios para essa etapa é o meio Synthetic Oviductal Fluid (SOF) (SOUZA; ABADE, 2018).

---

<sup>1</sup> Figura disponível em: <https://www.projetoalfa.com.br/blog/qualidade-do-embriao>. Acesso em: 10 nov. 2022.

**Figura 3 – Avaliação morfológica do embrião até o 6º dia**



Fonte: IPGO (2019)<sup>2</sup>

O desenvolvimento dos oócitos pode ser interpretado da seguinte forma: o dia da OPU como dia 1 (D -1), a fase de fecundação *in vitro* como dia 0 (D0), passados 24h, temos o dia-1 (D1) que é a etapa de cultivo *in vitro*. O dia-3 (D3) são passadas 48 horas, que são realizadas as etapas de 1º feeding e clivagem. Para o dia-5 espera-se por mais 48 horas. O 2º feeding, (processo onde substitui o meio de cultura onde estão inseridos os embriões, e no dia 6 (D6) realiza-se a previsão e no dia 7 (D7) a taxa de blastocisto é avaliada e acontece a saída dos embriões para envase a fresco ou congelamento).

Segundo Missio (2015, p. 24):

Os embriões são avaliados sob estereomicroscópio quanto a clivagem em D2 (48 horas após a FIV) e em D6, D7 e D8 para as taxas de blastocistos. Essas avaliações em vários dias de CIV, serve para prever a viabilidade do embrião, através do seu estágio de desenvolvimento e morfologia.

São classificados da seguinte forma:

- **Mórula (Mo):** é possível distinguir individualmente os blastômeros e sua massa ocupa quase todo o espaço perivitelino. A massa embrionária possui no mínimo 16 células.
- **Mórula compacta (Mc):** D5-D6, possui aproximadamente 32-64 blastômeros. Seus blastômeros estão unidos e constituem uma massa compacta que ocupa de 60-70% do espaço perivitelino, sendo a compactação considerada com um dos sinais da diferenciação embrionária embora os blastômeros conservem sua capacidade totipotente.
- **Blastocisto inicial (Bi):** D7, possui 100-200 células. Caracteriza-se pelo começo do transporte do fluido das células trofoectodérmicas e pela formação do blastocelo no

<sup>2</sup> Figura disponível em: <https://ipgo.com.br/fertilizacao-in-vitro-bebe-de-proveta-icsi/>. Acesso em: 10 nov. 2022.

interior do embrião. O Bi ocupa de 70-80% do espaço perivitelino, sendo possível diferenciar o trofoblasto da massa celular interna.

- **Blastocisto (Bi):** D7-D8, contém 100-200 células. Existe uma evidente diferenciação entre as células do trofoblasto e a massa celular interna (disco embrionário) mais escura. A blastocela é evidente e o embrião ocupa a maior parte do espaço perivitelino, nesta fase, também é possível a diferenciação visual da massa celular interna e do trofoblasto.

- **Blastocisto expandido (Bx):** D7-D8, o embrião contém mais de 200 células, nesse ponto o diâmetro aumenta consideravelmente com o consequente adelgaçamento da zona pelúcida (ZP), que chega a atingir um terço de sua espessura inicial. A pressão crescente do blastocisto em crescimento provoca a ruptura da ZP, através da qual ocorre a eclosão.

- **Blastocisto eclodido (Be):** D8-D9, com 200-800 células, os embriões são liberados da ZP. Podendo estar parcialmente fora da ZP (blastocisto em eclosão- Bn) ou totalmente eclodidos. Embriões nesta fase são extremamente frágeis (MISSIO, 2015, p. 24).

## 2.6 Congelamento de embriões

Após a classificação, os embriões podem ser destinados a implantação ou criopreservação. A criopreservação de embriões permite a melhor utilização dos embriões excedentes da transferência de embriões (TE) e da produção *in vitro* de embriões (PIV). Para melhorar os índices de sobrevivência embrionária ao processo de congelamento é necessária a utilização de substâncias denominadas crioprotetores (SANTIN; BLUME; MONDADORI, 2012).

Atualmente as técnicas de criopreservação mais utilizadas são a directtransfer e a técnica de vitrificação de embriões (SOUZA; ABADE, 2018). O congelamento de embriões Direct Transfer – DT, baseia-se em uma forma de congelamento lenta e clássica. Cujo objetivo é produzir um embrião congelado para transferência direta. Neste procedimento é necessário um equipamento específico, a máquina de congelar embriões TK-1000®, e logo em seguida são armazenados no botijão de nitrogênio (-196°C) (GOMES; SANTOS, 2020).

Já a vitrificação é um método de congelamento ultrarrápido, que permite acelerar significativamente o processo de criopreservação do embrião sem a utilização de um congelador programável de alto custo, tornando assim o processo rápido, prático e menos oneroso (SANTIN; BLUME; MONDADORI, 2012).

O DMSO é um dos crioprotetores intracelulares com alto peso molecular (PM =78,13) devido a sua facilidade em induzir o estado vítreo, levou a ser um dos primeiros crioprotetores utilizados nas soluções de vitrificação de embriões (GOMES; SANTOS, 2020).

Os crioprotetores intracelulares são importantes constituintes da solução de congelamento/vitrificação, sendo a presença intracelular destes, essencial na prevenção da formação de cristais de gelo, impedindo também a ocorrência de danos

tóxicos e osmóticos. Uma das suas funções é de baixar o ponto de solidificação. Isto é benéfico por várias razões, principalmente por fornecer um maior tempo para a ocorrência da desidratação da célula, diminuindo a formação de cristais de gelo intracelulares (GOMES; SANTOS, 2020, p. 888).

### **3 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS E DISCUSSÃO**

O estágio foi realizado no laboratório de embriões da ABS Global, no município de Mogi Mirim - São Paulo. Como supervisor de estágio, dispôs o médico veterinário Rafael Martins, responsável pelo laboratório de embriões, o qual acompanhou e monitorou todas as atividades semanais, totalizando 486 h.

O estágio foi desenvolvido acompanhando as atividades diárias realizadas no laboratório de embriões. Auxiliando nas rotinas do laboratório e no preenchimento de planilhas; higienização e esterilização dos materiais do laboratório; limpeza das incubadoras; acompanhando a recepção de oócitos; auxílio no preparo dos tubos para OPU (aspiração de oócitos); auxílio e acompanhamento na fertilização in vitro de embriões (FIV); acompanhamento das rotinas de protocolos de verificação, desvitrificação de embriões e direct transfer.

#### **3.1 Limpeza, Manutenção e Esterilização**

Para evitar contaminação dentro do ambiente de PIVE (Produção In vitro de embriões), todos os colaboradores do laboratório devem fazer a higienização das mãos antes de adentrar no laboratório, também devem utilizar jalecos, pro pé, mulheres devem estar com os cabelos presos; e evitar a utilização de produtos que deixam resíduos.

A limpeza dos equipamentos do laboratório era realizada nas segundas feiras, utilizando álcool 70%, clorexidina e água destilada para a limpeza das superfícies. É feita a troca de água das incubadoras, as mesmas são limpas e esterilizadas. Na estufa a temperatura é aferida, é feito a troca de água, e medição de CO<sub>2</sub>.

### 3.2 Preparação de tubo de MIV (Maturação in vitro) e meio de lavagem

Em tubos de Falcon é preparado o meio de lavagem e gás (de 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>). São feitas alíquotas de 400ul de meio MIV para os tubos e 300ul de óleo mineral; esses tubos com meios são gasificados (de 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>) por 15 segundo e tampados com rolhas de silicone. Após isso são colocados na geladeira.

Para o preparo da lavagem, multiplica-se o número de doadoras por 500ul, colocando 5 ml de lavagem em tubos de Falcon, evitando a perda de pH.

**Figura 4 – Incubadora de Laboratório de CO<sub>2</sub>**



Fonte: Figura retirada da página virtual Medical Expo<sup>3</sup>

### 3.3 Coleta e recepção de oócitos

Para ser feita a aspiração folicular deve ser feita uma seleção criteriosa das doadoras, deve ser observado as características reprodutivas, padrão genético, histórico de negação e aleitamento da cria, escore corporal, características genéticas que sejam interessantes para o proprietário, entre outros.

A aspiração folicular é uma biotécnica reprodutiva moderna, com o objetivo de coletar oócitos de fêmeas bovinas, os mesmos são destinados a fecundação em laboratório, e

---

<sup>3</sup> Figura disponível em: <https://www.medicalexpo.com/pt/prod/thermo-scientific/product-78678-506932.html>. Acesso em: 10 nov. 2022.

posteriormente transplantados. Técnica essa realizada por médicos veterinários, com auxílio da ultrassonografia. Os oócitos utilizados aspirados de folículos e coletados quando estiverem maduros e levados em meio de maturação para o laboratório de fertilização por meio de transportadoras de embriões (TED).

**Figura 5 – Transportadora de oócitos e embriões (TED)**



Fonte: Arquivo pessoal. ABS Global, laboratório de embriões, Mogi Mirim - São Paulo, 06 jul. 2021.

Ao chegar ao laboratório os oócitos são recepcionados em tubos de ensaio vedados com rolhas de silicone. Retira-se as rolhas dos tubos, que são colocadas nas incubadoras de trabalho para que haja troca gasosa, onde vão permanecer por 24 horas para a realização da FIV (Fertilização in vitro).

### 3.4 FIV (Fertilização *in vitro*) (D0)

São utilizadas placas petris que identificadas nas tampas com o nome do procedimento (FIV), nome do cliente, numero de vacas e nome do touro a ser utilizado. No fundo das placas são desenhados quadrantes com o número e a quantidade de doadoras e gotas de meio FIV) a serem recebidas.

O meio para fertilização é o “FIV Pronto ABS”. Cerca de 2 horas antes do uso, são suplementados com HE, penicilamina-hipotaurina-epinefrina (PHE), filtrados e mantidos aquecidos em incubadora, equivalendo para FIVs que ocorram pela manhã ou pela tarde (SOUZA, 2021, p. 21).

Para a realização da FIV, é necessário realizar o cálculo e o preparo dos meios para a FIV, fornecendo todas as informações necessárias para a realização deste cálculo. A FIV é realizada entre 22 e 26 horas após o início da MIV. Vacas com produção de até 35 oócitos são adicionados 1 gota do meio de FIV mais meio de lavagem. Já uma produção acima de 35 oócitos são adicionadas 2 gotas de meio de TL mais meio FIV.

Os oócitos são retirados do meio de maturação e passados para placas de petri com meio FIV Stoker com adição de epinefrina (PHE), TL sêmen e antibiótico.

Com os meios prontos, os mesmos são adicionados em placas petris identificadas com o nome do cliente, nome da vaca e o touro que será utilizado para a fertilização e a data da fertilização.

Para a FIV são utilizadas doses de sêmen sexado ou convencional. As palhetas são descongeladas a temperaturas de 37°C, por 45 a 60 segundos. Para cada dosagem de sêmen é preparado um meio diferente que é colocado em pellet, após o preparo deste sêmen, utiliza se a centrifuga.

Na centrifuga as doses de sêmen passam por dois ciclos de rotação; no primeiro ciclo de rotação, se a dose for sexada, o tempo será de 10' a 2500 RPM (419g), após a centrifuga o sobrenadante é desprezado, e adiciona-se 1ml de meio FIV pronto.

Na segunda rotação o tempo será de 5' a 1700 RPM (194g). Após isso a solução é acondicionada em microtubos de 0.6 ml. São adicionados 10ul de dose do sêmen na placa petri contendo os oócitos para fertilizar.

Para dose de sêmen convencional, a primeira rotação é de 5' a 9000 RPM (5.400g), após a centrifugação é retirado o sobrenadante e adicionado 1ml de meio de FIV touro.

Segunda rotação é de 3' a 2000 RPM (100g), o pellet de espermatozoide é removido, e acondicionados em microtubos a 0,6 ml.

Após todos os procedimentos de cálculo, preparo do meio FIV, lavagem de oócitos e preparo do sêmen, os oócitos estão prontos para a FIV. Os oócitos fertilizados são colocados em na incubadora, ficando por 22 a 24 horas.

### **3.5 Cultivo in vitro (CIV) (D1)**

Neste procedimento os zigotos são retirados do meio FIV, passando para o meio de cultivo, removendo os espermatozoides ainda aderidos na zona pelúcia e as células cumulus. Esse procedimento conta o auxílio de uma pipeta é realizado a lavagem em gotas contendo o meio CIV e depois transferidas para outra placa contendo o meio SOF. Os oócitos são lavados pelo menos duas vezes no meio SOF. Após as 48 horas do início do cultivo o meio será reduzido e trocado. Após esse procedimento de troca de meio, são validadas quantas estruturas se dividiram e o número de células presente nelas. A apenas os oócitos que foram fecundados são transferidos para outro meio e levados para a incubadora CIV, permanecendo por 72 horas.

### **3.6 Clivagem (CIV) (D5)**

Nessa etapa realiza se a contagem das estruturas clivadas, observando a divisão dos blastômeros, caso não tenha ocorrido divisão das células formando mórulas são descartados. Após a contagem as estruturas voltam para a incubadora, para que no próximo dia seja feita a previsão.

### **3.7 Previsão (D6)**

Neste procedimento é feita a avaliação e contagem das mórulas e estimativa de quantidade de embriões. A mórula é o estágio pré-embriônico, que acontece após o óvulo ser fertilizado pelo espermatozoide.

A partir deste procedimento é feito o planejamento e preparação para o dia 7 (D7).

### **3.8 DIA 07 (D7)**

São selecionados os blastocistos - estágio de desenvolvimento onde possui uma cavidade em seu interior chamada de blastocele, expandidos no sétimo dia de desenvolvimento.

Os procedimentos feitos no D7 são de acordo com a demanda do cliente. Eles são: Transferência de embriões (TE), Verificação in vitro (VIT) e Direct transfer (DT).

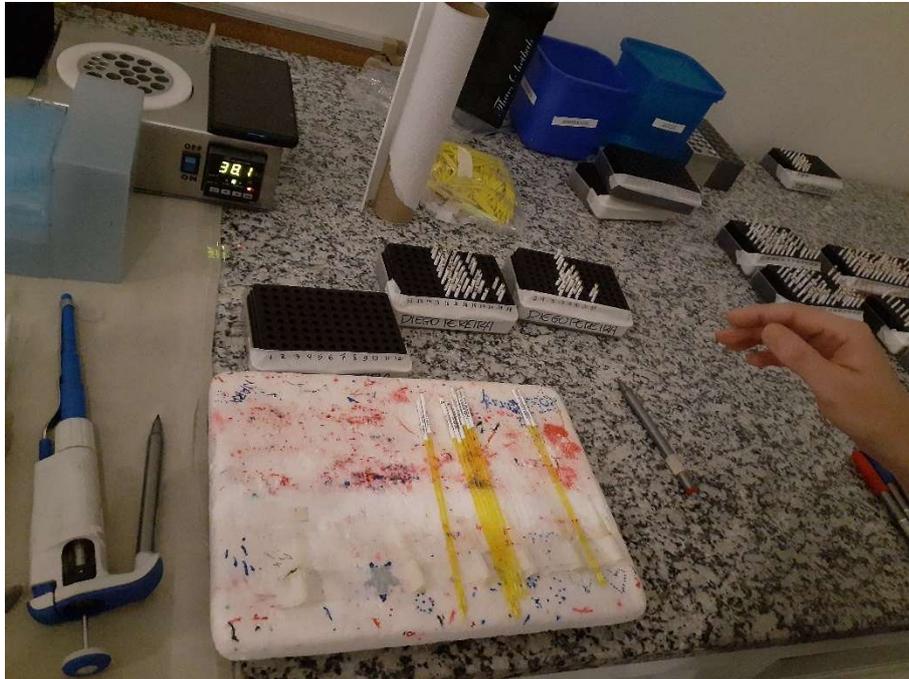
**Figura 6 – Seleção dos blastocistos**



Fonte: Arquivo pessoal. ABS Global, laboratório de embriões, Mogi Mirim - São Paulo, 06 jul. 2021.

- TE – Neste procedimento os embriões são envasados em palhetas, para posteriormente serem transferidos em receptoras.

**Figura 7 - Palhetas de envase**



Fonte: Arquivo pessoal. ABS Global, laboratório de embriões, Mogi Mirim - São Paulo, 06 jul. 2021.

- VIT - Envasar os embriões, individualmente, em OPS, em um volume máximo de 2  $\mu$ L da solução, e submergi-los, imediatamente, em nitrogênio líquido, onde serão armazenados.

**Figura 8 – Mesa com equipamentos para vitrificação**



Fonte: Arquivo pessoal. ABS Global, laboratório de embriões, Mogi Mirim - São Paulo, 06 jul. 2021.

- DT - Técnica de congelamento mais lento. Consiste no embrião congelado para transferência direta. Neste procedimento é necessário um equipamento específico: a máquina de congelar embriões.

**Figura 9 – Congelamento de embriões**



Fonte: Arquivo pessoal. ABS Global, laboratório de embriões, Mogi Mirim - São Paulo, 06 jul. 2021.

**Figura 10 - máquina de congelar embriões TK-1000®**



Fonte: Arquivo pessoal. ABS Global, laboratório de embriões, Mogi Mirim - São Paulo, 06 jul. 2021.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente o Brasil é líder na produção de genética graças ao avanço dos estudos na área de biotecnologia. A produção *in vitro* de embriões vem ocupando espaço no mercado, devido os custos serem viáveis e inúmeros benefícios que tornam a técnica acessível para quem busca um diferencial no seu rebanho.

As técnicas apresentadas

O estágio supervisionado possibilitou a oportunidade de adquirir experiência na ABS Global, uma das maiores e importantes produtoras de embriões do mundo, com cerca de 41,5% total de embriões faturáveis no mundo. Possibilitando vivenciar essa técnica e colocando em pratica a todo conhecimento adquirida em minha trajetória acadêmica, e também obtenção de novos conhecimentos e aperfeiçoamento de técnicas laboratoriais. Os conhecimentos e a vivencia adquirida durante o estágio são de suma importância para a formação profissional.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **Inseminação artificial**. 2022. Disponível em: [https://asbia.org.br/?page\\_id=5071](https://asbia.org.br/?page_id=5071). Acesso em: 20 set. 2022.

BARBOSA, Rogério Taveira; MACHADO, Rui. **Panorama da inseminação artificial em bovinos**. Dados eletrônicos. - São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2008. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48734/1/Documentos84.pdf>. Acesso em: 20 set. 2022.

DAYAN, André. **Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação in vitro**. 2001, 56f. Dissertação (mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001. Disponível em: [https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/98230/dayan\\_a\\_me\\_botfmvz.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/98230/dayan_a_me_botfmvz.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Acesso em: 05 nov. 2022.

GODOI, Carlos Rosa; SILVA, Ednea Freitas Portilho; DE PAULA, Adriano Pereira. Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. **PUBVET**, v. 4, p. Art. 802-808, 2010. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/artigo/2150/inseminaccedilatildeo-artificial-em-tempo-fixo-iatf-em-bovinos-de-corte>. Acesso em: 20 set. 2022.

GOMES, Rafael Silva; SANTOS Kleber Xavier dos. Produção e Utilização de Embriões Bovinos por Vitrificação e Direct Transfer. *In: Anais...* Simpósio de TCC do Centro Universitário, p. 886-896, 2020. Disponível em: [http://nippromove.hospedagemdesites.ws/anais\\_simposio/arquivos\\_up/documentos/artigos/69521fffa1aec4fd31da1d0216fccdf0.pdf](http://nippromove.hospedagemdesites.ws/anais_simposio/arquivos_up/documentos/artigos/69521fffa1aec4fd31da1d0216fccdf0.pdf). Acesso em: 20 set. 2022.

GONÇALVES, Rômany Louise Ribeiro; VIANA, João Henrique Moreira. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 2, p. 156-159, abr./jun. 2019, 2019. Disponível em: [http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p156-159%20\(RB785\).pdf](http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p156-159%20(RB785).pdf). Acesso em: 15 out. 2022.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 33, n. 2, p. 82-94, 2009. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/pag82-94.pdf>. Acesso em: 05 nov. 2022.

GUEMRA, Samuel *et al.* Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 1616-1624, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/M85Gp8zJTPtdc6DXb88T3kw/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 05 nov. 2022.

MACHADO, Grazieli Marinheiro. **Efeito de diferentes protocolos de Percoll na qualidade espermática e na produção in vitro de embriões bovinos**. 2009, 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009. Disponível em:

[https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/4678/1/2009\\_GrazieliMarinheiroMachado.pdf](https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/4678/1/2009_GrazieliMarinheiroMachado.pdf).

Acesso em: 05 nov. 2022.

MARIANO, Renata Sitta Gomes *et al.* Aspiração folicular em ruminantes–revisão de literatura. **Revista Investigação em Medicina Veterinária**, v. 14, n. 6, p. 46-53, 2015.

MELLO, Raquel Rodrigues Costa *et al.* Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **R. bras. Reprod. Anim.**, p. 58-64, 2016. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vti-15009>. Acesso em: 15 out. 2022.

MISSIO, Daniele. **Relatório de estágio curricular supervisionado em medicina veterinária–área de biotecnologia da reprodução**. 2015, 74f. Relatório de Graduação, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2015. Disponível em: <https://dspace.unipampa.edu.br/bitstream/riu/5136/3/DANIELE%20MISSIO.pdf>. Acesso em: 05 nov. 2022.

OLIVEIRA, Clara Slade; SARAPIÃO, Raquel Varella; QUINTÃO, Carolina Capobianco Romano. **Biotécnicas da reprodução em bovinos**: minicursos ministrados durante o 3º Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em Bovinos” no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2014. 52 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/124201/1/Biotecnicas-para-Producao-em-Bovinos.Documentos-175.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2022.

PASA, Camila. Transferência de embriões em bovinos. **Biodiversidade**, v. 7, n. 1, p. 66-74, 2008. Disponível em:

<https://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/biodiversidade/article/view/49>. Acesso em: 02 nov. 2022.

PELLEGRINO, Carlos Augusto Gontijo. **Avaliação econômica da produção in vitro de embriões bovinos de diferentes grupos genéticos em sistema comercial**. 127f. 2013. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte. 2013. Disponível em: [https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/SMOC-A39NL6/1/tesecarlospellegrino\\_281013\\_.pdf](https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/SMOC-A39NL6/1/tesecarlospellegrino_281013_.pdf). Acesso em: 02 nov. 2022.

PENITENTE FILHO, Jurandy Mauro; OLIVEIRA, Fabrício Albani; TORRES, Ciro Alexandre Alves. Produção de embriões bovinos in vivo e in vitro. *In: Anais... 83ª Semana do Fazendeiro*, Universidade Federal de Viçosa, 2011. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Jurandy-Penitente-Filho/publication/230794393\\_PRODUCAO\\_DE\\_EMBRIOES\\_BOVINOS\\_IN\\_VIVO\\_E\\_IN\\_VITRO/links/0912f5047b1d07fc89000000/PRODUCAO-DE-EMBRIOES-BOVINOS-IN-VIVO-E-IN-VITRO.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Jurandy-Penitente-Filho/publication/230794393_PRODUCAO_DE_EMBRIOES_BOVINOS_IN_VIVO_E_IN_VITRO/links/0912f5047b1d07fc89000000/PRODUCAO-DE-EMBRIOES-BOVINOS-IN-VIVO-E-IN-VITRO.pdf). Acesso em: 05 nov. 2022.

RENESTO, Andréa; COELHO, L. A. **Associação das biotécnicas**: Aspiração folicular guiada por ultrassonografia e superovulação na produção in vitro e in vivo de embriões bovinos. 59f. 2004. (Mestrado). Arquivos da Faculdade de Ciências Agrárias UNESP. Disponível em: [http://www.avanticonsultoria.com.br/downloads/tese\\_mestrado.pdf](http://www.avanticonsultoria.com.br/downloads/tese_mestrado.pdf). Acesso em: 05 nov. 2022.

ROLLEMBERG SANTIN, Tiago; BLUME, Hélio; GIANELLA MONDADORI, Rafael. Criopreservação de embriões–metodologias de vitrificação. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 4, p. 561-574, 2012. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/Rafael-Mondadori/publication/277228713\\_CRIOPRESERVACAO\\_DE\\_EMBRIOES\\_-](https://www.researchgate.net/profile/Rafael-Mondadori/publication/277228713_CRIOPRESERVACAO_DE_EMBRIOES_-)

METODOLOGIAS\_DE\_VITRIFICACAO/links/563233e408ae506cea6a65c7/CRIOPRESE RVACAO-DE-EMBRIOES-METODOLOGIAS-DE-VITRIFICACAO.pdf. Acesso em: 05 nov. 2022.

SALVADOR, Daniel Fábio. Quatro gerações de biotecnologias em reprodução animal. **Revista Educação Pública**, v. 19, n. 31, nov. 2019. Disponível em: <https://educacaopublica.cecierj.edu.br/artigos/19/31/quatro-geracoes-de-biotecnologias-em-reproducao-animal>. Acesso em: 05 nov. 2022.

SEBRAE. **Embriões aumentam produtividade na pecuária**. 2022. Disponível em: <https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/embrioes-aumentam-produtividade-na-pecuaria,2c21abfdb6fa0810VgnVCM100000d701210aRCRD>. Acesso em: 05 nov. 2022.

SILVA, Ana Eliza da *et al.* Aspiração folicular em bovinos: revisão. **Sinapse Múltipla**, v. 10, n. 1, p. 28-30, 2021. Disponível em: <http://periodicos.pucminas.br/index.php/sinapsemultipla/article/view/26653/18379>. Acesso em: 05 nov. 2022.

SILVA, Jaqueliney Soares da *et al.* Aspectos comerciais da transferência de embriões e fertilização in vitro em bovinos-revisão. *Nutritime Revista Eletrônica, on-line, Viçosa*, v.12, n.5, p.4316-4319, set-out, 2015. Disponível em: <https://nutritime.com.br/wp-content/uploads/2020/02/Artigo-332.pdf>. Acesso em: 05 nov. 2022.

SILVA, Roberta Reis *et al.* Produção in Vitro de Embriões Bovinos: Estado da Arte. **Colloquium Agrarie**. 2017. p. 402-415. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/20f2/54253c17e6a466985c3e20e642352184fe43.pdf>. Acesso em: 05 nov. 2022.

SOUZA, Aliny Silva. **Relatório de Estágio Curricular Supervisionado: Produção in vitro de embriões bovinos**. 2021, 40f. Relatório de Graduação, Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína. Araguaína/TO. 2021. Disponível em: <http://umbu.uft.edu.br/bitstream/11612/4149/1/Aliny%20Silva%20Souza%20%20Relat%c3%b3rio.pdf>. Acesso em: 05 nov. 2022.

SOUZA, Natielly Sampaio de; ABADE, Cristiane Caroline. Produção in vitro de embriões bovinos: etapas de produção e histórico no Brasil. **Ciência Veterinária UniFil**, v. 1, n. 3, p. 95-108, 2018. Disponível em: <http://periodicos.unifil.br/index.php/revista-vet/article/view/988/923>. Acesso em: 05 nov. 2022.

VIEIRA, Rômulo José. Biotécnicas aplicadas à reprodução bovina: generalidades. **Ciência Animal, Fortaleza**, v. 22, n. 1, p. 55-65, 2012.