



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL GOIANO
CAMPUS URUTAÍ
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO

Reprodução de Bovinos

Aluno (a): Florence Vitória Sousa Resende
Orientador (a): Prof. Dr. Jair Alves Ferreira Júnior

URUTAÍ-GO
2025

FLORENCE VITÓRIA SOUSA RESENDE

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO

Reprodução de Bovinos

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí como parte dos requisitos para conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária.

Orientador (a): Jair Alves Ferreira Junior
Supervisor (a): Rodrigo Camponogara Boher

URUTAÍ-GO

2025

**Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema Integrado de Bibliotecas do IF Goiano - SIBi**

R433c Resende, Florence Vitória Sousa
 Clonagem de Bovinos pela Técnica Convencional de
 Transferência de Células Somáticas / Florence Vitória Sousa
 Resende. Urutaí 2024.

 63f. il.

 Orientador: Prof. Dr. Jair Alves Ferreira Junior.
 Tcc (Bacharel) - Instituto Federal Goiano, curso de 0120124 -
 Bacharelado em Medicina Veterinária - Urutaí (Campus Urutaí).
 1. Clonagem. 2. Biotecnologia. 3. Melhoramento Genético. I.
 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)
☐ Dissertação (mestrado)
☐ Monografia (especialização)
☒ TCC (graduação)

- ☐ Artigo científico
☐ Capítulo de livro
☐ Livro
☐ Trabalho apresentado em evento

☐ Produto técnico e educacional - Tipo:

Nome completo do autor:

Florence Vitória Sousa Resende

Matrícula:

2020101202240400

Título do trabalho:

Clonagem de Bovinos pela Técnica Convencional de Transferência Nuclear de Células Somáticas

RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial: ☒ Não ☐ Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 1 / 0 / 202

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 incluídos 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.

Documento assinado digitalmente
gov.br FLORENCE VITORIA SOUSA RESENDE
Data: 19/03/2025 16:53:59-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Uberaba

Local

1 / 0 / 202

Data

Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)



ATA DE APROVAÇÃO DE TRABALHO DE CURSO

Às 15:26 horas do dia 12 de março de 2025, reuniu-se na sala nº 41 do Prédio Medicina Veterinária do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Urutai, a Banca Examinadora do Trabalho de Curso Intitulado "Clonagem bovina pelo técnica convencional de transferência nuclear por células somáticas"

composta pelos professores Wesley José de Souza
Ruan da Cruz Paulino

, para a sessão de defesa pública do citado trabalho, requisito parcial para a obtenção do Grau de Bacharelado em Medicina Veterinária. Para fins de comprovação, o aluno (a) Florencia Vitória Sousa Resende foi considerado Aprovado(a) (APROVADO ou NÃO APROVADO), por unanimidade, pelos membros da Banca Examinadora.

Assinatura dos membros da Banca Examinadora	Situação (Aprovado ou Não Aprovado)
1. <u>Ruan da Cruz Paulino</u>	<u>Aprovado</u>
2. <u>Wesley José de Souza</u>	<u>Aprovado</u>
3. <u>Maís Alves Ferreira Júnior</u>	<u>Aprovado</u>

Urutai-GO, 12 de março de 2025.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder forças nos momentos difíceis e por guiar meu caminho com fé e esperança, e a Nossa Senhora Aparecida, por ser meu amparo e intercessora nos momentos de incerteza.

À minha mãe, Jacqueline, por todo o amor, apoio incondicional e incentivo ao longo dessa caminhada. Ao meu pai, Israel (in memoriam), que, mesmo não estando fisicamente presente, sempre será uma inspiração e uma parte essencial de quem sou.

Aos meus tios e tias, que sempre acreditaram em mim e me deram suporte de diversas formas ao longo dessa jornada.

Aos meus amigos da faculdade, que tornaram essa trajetória mais leve, em especial ao meu querido grupo “A Patotinha”, por todas as risadas, trocas de conhecimento e apoio mútuo.

Às minhas melhores amigas, Elizana e Maria Elisa por estarem ao meu lado em todos os momentos, compartilhando sonhos, desafios e conquistas.

Ao Médico Veterinário Dr. Emílio Hein, por me acolher durante dois anos de estágio, por me ensinar tanto e por abrir portas fundamentais para minha formação profissional.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que esse trabalho se tornasse realidade, minha eterna gratidão.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – Relatório de Estágio Curricular

Figura 1: Geneal – Genética e Biotecnologia Animal – Fachada da empresa em Uberaba MG.....	7
Figura 2: Rastreamento e Classificação de Oócitos Bovinos.....	12
Figura 3: Classificação da qualidade dos oócitos bovinos com base na integridade das células do cumulus e na aparência do citoplasma. Grau I (a, b, c, e), grau II (d, f), grau III (g), grau IV (h, i)	13
Figura 4: Treinamento Pessoal de Cultivo in vitro	16
Figura 5: Criopreservação de embriões por técnica DT	17
Figura 6: Parto Natural Auxiliado	20
Figura 7: Nebulização em bezerra com pneumonia	24
Figura 8: Manejo com comprometimento de ferida de cesarea	26

CAPÍTULO 2 – Clonagem de Bovinos pela Técnica Convencional de Transferência Nuclear de Células Somáticas

Figura 1: Primeira imagem do clone da vaca nelore Viatina-19 FIV Mara Móveis	33
Figura 2: a e b oócitos imaturos, c e d oócitos maduros. Nota-se a ampliação das células do cumulus no CCO maturado (c) e a presença do corpúsculo polar extrusado no oócito maduro (d), indicado pela seta na imagem	34
Figura 3: Aparelho de eletrofusão e eletroporação	37
Figura 4: Passo a passo da técnica convencional de clonagem por TNCS. a) oócito maturado e desnudo antes da enucleação; b) aspiração do corpúsculo polar contendo o material genético; c) oócito enucleado; d) material genético corado; e) cultivo celular de fibroblasto por isolamento; f) fibroblasto já isolado; g) inserção da célula doadora proveniente do fibroblasto sob a ZP do oócito enucleado; h) célula fusionada; i) clivagem do embrião; j) blastocisto desenvolvido; k) bezerro do clone	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Ca ²⁺] _i	Concentração Intracelular de Cálcio
6-DMAP	Dimetilaminopurina
BE	Benzoato de Estradiol
BSA	Albumina Sérica Bovina
BI	Blastocisto Inicial
BL	Blastocisto Eclodido
BX	Blastocisto Expandido
CCOs	Complexo <i>Cumulus</i> -Oócito
CHX	Ciclohexamida
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i>
CL	Corpo Lúteo
D0	Dia 0
D1	Dia 1
D4	Dia 4
D6	Dia 6
D7	Dia 7
D8	Dia 8
D17	Dia 17
DPBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato de Dulbecco
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Medium
DT	Direct Transfer
ECG	Gonadotrofina Coriônica Equina
ECP	Cipionato de Estradiol
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
HMC	<i>Handmade Cloning</i>
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IM	Intramuscular
IO	Ionicina
LAV	Meio de Lavagem
MII	Metáfase da Meiose II
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
MPF	Fator de Promoção da Maturação

OPU	Aspiração Folicular
P4	Progesterona
PHE	Penicilamina, hipotaurina e epinefrina
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
PGF2	Prostaglandina
TN	Transferência Nuclear
TNCS	Transferência Nuclear de Células Somáticas
TE	Transferência de Embriões
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
ZP	Zona Pelúcida

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR	5
1 IDENTIFICAÇÃO	5
1.1 Nome do Aluno	5
1.2 Matrícula	5
1.3 Nome do Supervisor	5
1.4 Nome do Orientador	5
2 LOCAL DE ESTÁGIO	5
2.1 Nome do local de estágio	5
2.2 Localização	6
2.3 Justificativa da escolha do campo de estágio	6
3 DESCRIÇÃO DO LOCAL E DA ROTINA DE ESTÁGIO	6
3.1. Descrição do local de estágio	6
3.2 Descrição da rotina de estágio	7
3.3 Resumo quantitativa das atividades	26
4 DIFICULDADES VIVENCIADAS	27
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
 CAPÍTULO 2 – CLONAGEM DE BOVINOS PELA TÉCNICA CONVENCIONAL DE TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS	 30
RESUMO	30
ABSTRACT	31
IMPORTÂNCIA E RELEVÂNCIA	33
ETAPAS DA CLONAGEM POR TNCS	33
ÉTICA E BEM-ESTAR ANIMAL NA CLONAGEM	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXOS	44

CAPÍTULO 1

1 IDENTIFICAÇÃO

1.1 Nome do(a) Aluno(a)

Florence Vitória Sousa Resende

1.2 Matrícula

2020101202240400

1.3 Nome do supervisor

Rodrigo Camponogara Bohrer possui graduação em Medicina Veterinária (2009) e Mestrado em Fisiopatologia da Reprodução Animal (2011) pela Universidade Federal de Santa Maria. Obteve o título de PhD em Ciência Animal pela McGill University, no Canadá, em 2016, e realizou um Pós-Doutorado Industrial na Semex Alliance/McGill University, também no Canadá, em 2018. Trabalhou como pesquisador na produção *in vitro* de embriões bovinos na ABS Pecplan entre 2018 e 2021. Foi sócio fundador da empresa CPEX Embriões de 2021 a 2023. Atualmente, é responsável pelos laboratórios de Fertilização *In Vitro* (FIV) e Clonagem Animal da Geneal Genética e Biotecnologia Animal.

1.4 Nome do orientador

Jair Alves Ferreira Junior, bacharel em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Goiás, no campus de Jataí, possui experiência em epidemiologia e diagnóstico anatomopatológico de doenças que afetam tanto animais domésticos quanto selvagens. Concluiu residência em anatomia patológica animal e obteve o mestrado em Ciências Animais na Universidade de Brasília (UnB), com foco em ictiopatologia. Além disso, é doutor em Saúde Animal pela mesma instituição, com ênfase em Patologia Veterinária. Atualmente atua como professor no ensino básico, técnico e tecnológico no Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí, lecionando Anatomia e Fisiologia Animal. Simultaneamente, é Professor Doutor na Faculdade Una em Catalão-GO, onde leciona nas disciplinas de Medicina Veterinária Investigativa, Zootecnia de Ruminantes e Sistemas Vitais.

2 LOCAL DE ESTÁGIO

2.1 Nome do local de estágio: Geneal – Genética e Biotecnologia Animal

2.2 Localização: BR-050, Km 184, Jardim Santa Clara, Uberaba – MG. 38038-050

2.3 Justificativa da escolha do campo de estágio:

A justificativa da escolha do local de estágio, se deu pela afinidade com a área de reprodução de bovinos desde quando me ingressei na faculdade de medicina veterinária, logo no primeiro período do curso. Desde o início sempre procurei realizar cursos e presenciar palestras extracurriculares na área da bovinocultura, tanto de corte quanto de leite para aperfeiçoar o conhecimento teórico prático na área. Sendo assim, foi a espécie animal que mais tive contato e experiências durante a graduação. Em relação ao local escolhido, foi devido à uma proposta que recebi de um veterinário, que eu já realizava estágio com o mesmo desde 2022, e que ele prestava serviços a essa empresa onde eu já havia ido várias vezes acompanhar, e por indicação me adentrei na Geneal Genética e Biotecnologia Animal, local onde foi de grandiosa aprendizagem da área de clínica médica de bezerros, reprodução e clínica cirúrgica de bovinos.

3 DESCRIÇÃO DO LOCAL E DA ROTINA DE ESTÁGIO

3.1 Descrição do local de estágio

O Grupo Brasif, que atua em diversas áreas, incluindo o agronegócio, fundou a Geneal – Genética e Biotecnologia Animal em 2009, com a visão de ser responsável pela evolução genética do Brasil, com base na experiência e na excelente genética bovina acumulada pelo grupo ao longo dos anos. Sediada em Uberaba - MG, o principal centro do Zebu brasileiro, a empresa conta com um laboratório moderno e uma equipe técnico-científica altamente qualificada, especializada em fertilização *in vitro* (FIV) e clonagem. Líder de mercado em clonagem bovina no país, a Geneal tem uma capacidade de produção média de 500 clones por ano.

A empresa mantém parcerias com renomadas empresas estrangeiras na melhoria genética animal e é amplamente reconhecida no mercado interno e externo. Atualmente, a Geneal Genética é dirigida pelo médico veterinário Rodolfo Rumpf, Comendador da Ordem Nacional do Mérito Científico, pesquisador titular da Embrapa e professor na Universidade de Brasília, no nível de pós-graduação. Rodolfo foi chefe da equipe responsável pela primeira

clonagem de bovinos no Brasil, realizada em 2001, resultando no nascimento de *Vitória*, um animal da raça Simental. Este foi o primeiro clone bovino bem-sucedido na América Latina, evento que repercutiu mundialmente. A clonagem, assim como a multiplicação de animais de alto padrão, é um fator importante no melhoramento genético do gado e uma tendência de longo prazo para impulsionar a produtividade da agropecuária brasileira, setor chave da economia nacional, conforme destaca a própria empresa.

Figura 1: Geneal – Genética e Biotecnologia Animal –
Portaria da empresa em Uberaba MG



Fonte: Arquivo Pessoal

3.2 Descrição da rotina de estágio

O estágio curricular foi realizado no período de 16 de setembro de 2024 a 20 de dezembro de 2024, com carga horária de 8 horas diárias, de segunda a sexta-feira, totalizando 40 horas semanais e 544 horas ao longo de todo o período. O estágio foi desenvolvido em duas áreas distintas dentro da Geneal. No laboratório, foram dedicados 24 dias, durante os quais realizei o acompanhamento de todos os procedimentos relacionados à clonagem e à fertilização *in vitro* (FIV). Já na fazenda, a carga horária foi de 71 dias. Na fazenda, onde realizei a maior parte do estágio, participei de atividades rotineiras como partos (naturais ou

cesarianas), aspiração folicular, transferência de embriões, diagnóstico gestacional, além de acompanhar o dia a dia da clínica neonatal de bezerros, entre outras atividades.

3.2.1 Produção in Vitro de Embriões

A produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE) é uma biotecnologia inovadora que transformou a reprodução animal e o melhoramento genético. Esse processo permite o desenvolvimento de oócitos bovinos (gametas femininos) em ambiente controlado para a obtenção de embriões, os quais podem ser transferidos para vacas receptoras para gestação.

A capacidade de gerar muitos descendentes a partir de uma única vaca doadora, utilizando a PIVE, tornou-se um componente essencial no melhoramento genético do rebanho, aumentando a eficiência reprodutiva e as práticas da agropecuária. O objetivo da PIVE é replicar, o mais próximo possível, os processos fisiológicos que normalmente ocorrem em uma vaca sob condições controladas.

A técnica é amplamente vista como uma ferramenta valiosa para a reprodução, visando à melhoria da qualidade genética dos rebanhos. Ela possibilita a rápida disseminação das melhores qualidades genéticas, encurta o intervalo entre gerações de descendentes e aumenta o número de bezerros gerados por vacas doadoras de alto valor.

3.2.2 ISOLAMENTO DE CÉLULAS

O primeiro procedimento para a clonagem é a obtenção da célula doadora do núcleo, realizada por meio da coleta de um fragmento de tecido do animal, em animais vivos na região perianal e em animais mortos um pedaço da orelha. O pedaço é retirado da região perianal, após tricotomia e antissepsia do local, sendo realizada anestesia epidural com 1 ml de lidocaína a 2% para cada 100 kg do animal. O fragmento retirado é colocado em um tubo contendo solução salina tamponada com fosfato (PBS), a 37°C, e é levado ao laboratório. O local da biópsia é suturado com pontos simples.

Para o cultivo da célula, o fragmento é cortado em mini fragmentos, que são depositados em uma placa de Petri com meio Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) e soro fetal bovino, sendo levados para uma incubadora a 38,5°C, com 5% de CO₂ e alta umidade por sete dias. Após esse período, o meio das placas de Petri é trocado, e as placas retornam para a incubadora nas mesmas condições. A partir desse momento, monitora-se a

velocidade de crescimento e expansão das células, que são transferidas para uma garrafa de cultivo contendo tripsina, para estimular sua multiplicação e formação de fibroblastos confluentes. Nesse estágio, as células podem ser envasadas em palhetas com solução DMSO, meio DMEM, soro fetal bovino e antibióticos. As palhetas são identificadas e inseridas em garrafas para criopreservação em nitrogênio, sendo armazenadas no banco genético do laboratório.

3.2.3 SELEÇÃO DE DOADORAS

As fêmeas selecionadas para o processo de clonagem devem ser de qualidade genética excepcional, estar em bom estado nutricional e apresentar ciclos estrais regulares. Anomalias anatômicas, como desvio cervical, e distúrbios reprodutivos, que podem resultar em patologias genéticas ou adquiridas, como aderências uterinas, tubárias e ovarianas, precisam ser descartadas durante a avaliação reprodutiva. Essas condições prejudicam a coleta, o desenvolvimento e o transporte adequado de gametas e embriões, tornando o procedimento inviável. Fêmeas prenhes ou com problemas uterinos, como mucometra, podem ser aspiradas, desde que os ovários estejam em condições adequadas e o manuseio seja possível.

As fêmeas de raças taurinas tendem a apresentar números inferiores de oócitos recuperados em relação às fêmeas zebuínas, uma vez que os animais zebuínos geralmente possuem maior número de folículos recrutados na onda folicular. Grande parte do sucesso da técnica de produção de embriões *in vitro* no Brasil pode ser atribuída a essa característica, como observado em animais da raça Nelore (PONTES et al., 2011).

3.2.4 SELEÇÃO DE RECEPTORAS

O sucesso no programa de Transferência de Embriões (TE) depende significativamente da escolha adequada das receptoras, uma vez que problemas podem levar a abortos, reabsorção embrionária e complicações durante o parto, como distocias. O ideal é selecionar novilhas ou vacas com pelo menos 350 kg, que tenham no mínimo dois ciclos estrais regulares e não apresentem problemas pélvicos ou nutricionais. É fundamental que, na seleção dessas receptoras, o porte físico esteja compatível com a raça da doadora e que as condições uterinas sejam adequadas, sem assimetrias.

3.2.5 OBTENÇÃO DE OÓCITOS

Existem três formas de coleta de oócitos: a técnica *slicing*, que é utilizada para doadoras que vieram a óbito, consistindo em um corte na camada cortical do ovário para liberar os oócitos; a técnica de aspiração folicular de ovários provenientes de abatedouros, utilizada para controle de qualidade de laboratórios, experimentos científicos e clonagem por transferência nuclear de células somáticas. Nessa técnica, os ovários são coletados dentro do abatedouro na linha de evisceração, colocados em solução fisiológica na temperatura de 35 a 37°C e transportados até o laboratório, onde os folículos são aspirados manualmente com uma seringa e agulha, ou por bomba a vácuo. A aspiração folicular *in vivo* antigamente era realizada por laparotomia, maneira que foi deixando de ser realizada devido ao complicado manejo pós cirúrgico e tempo gasto, gerando um baixíssimo custo-benefício. Apenas na década de 1980, foi tornando popular o procedimento de punção folicular guiada por ultrassonografia, técnica que em menor tempo tinha um número maior de animais punccionados e podia-se repetir mais rápido a frequência da aspiração no mesmo animal.

A aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (OPU - Ovum Pick Up) é um método de alto custo-benefício para a recuperação de oócitos de doadoras vivas de bovinos, sendo capaz de produzir embriões viáveis a partir da fertilização *in vitro* (FIV). Essa tecnologia é amplamente praticada em diversos países, com destaque para o Brasil, onde muitos embriões são produzidos por meio dessa técnica. A eficiência da OPU pode ser influenciada por vários fatores, como o tipo de aparelho de ultrassom, a experiência do veterinário, a frequência das aspirações e o tipo de agulha utilizada. Esses fatores podem impactar a capacidade de os oócitos se desenvolverem *in vitro*, prejudicando a produção e a qualidade dos embriões, o que resulta em perdas de material genético e compromete os programas de.

Os acessórios para o procedimento de aspiração folicular devem estar bem alinhados e montados. As agulhas são de uso descartável e tamanho 18 ou 19 G. A pressão negativa gerada pela bomba a vácuo deve estar entre 60 e 100 mm de mercúrio, ou para facilitar a calibragem, aconselha-se mensurar o volume de líquido aspirado por minuto, o ideal é pressão entre 10 e 20 mL de líquido aspirado por minuto. Em relação aos transdutores, existem variados disponíveis no mercado, vai do profissional escolher o que melhor lhe atende contando que seja de 7.5 MHz, que é o recomendável para punção. A respeito de tubos Falcon, rolha e

circuito o veterinário deve optar por reutilizar, já que alguns equipamentos há a possibilidade de esterilização para próximo uso.

Em fêmeas bovinas, tanto o número quanto a qualidade dos oócitos obtidos pela aspiração são influenciados pelo momento que é realizada a coleta no ciclo estral do animal, devido às características de seleção e dominância que ocorrem durante as ondas de crescimento folicular. A presença de um folículo dominante inibe o desenvolvimento de outros folículos, e consequentemente os gametas iniciam a degeneração. Assim, é aconselhado sincronizar a onda de crescimento folicular das doadoras para melhorar a competência dos oócitos recuperados. Dessa forma, os oócitos são recuperados no início da onda folicular, minimizando os efeitos adversos do folículo dominante. O procedimento para sincronização de onda folicular baseia-se em: no D0 aplica-se 2 mg de benzoato de estradiol (2 mL), 0,5 mg de D-cloprostenol (2 mL), 1 g de progesterona (dispositivo intravaginal) e no D6 retira-se o implante de progesterona e realiza a aspiração folicular. A sincronização pode ser realizada com diversos protocolos distintos, mas sempre seguindo o conceito que o benzoato de estradiol juntamente com a progesterona irão provocar atresia do folículo dominante e início de uma nova onda de crescimento folicular em média 4 dias após sua aplicação, e o análogo de prostaglandina é responsável pela lise do corpo lúteo (luteólise), que pode dificultar o procedimento de aspiração por ser muito vascularizado e de tamanho considerável.

O procedimento se inicia quando a doadora entra no brete e é contida; a lavagem perineal com água é feita para evitar contaminação de todo o processo; é realizada a anestesia epidural de 40 mg a 80 mg (2 a 4 mL) de cloridrato de lidocaína a 2% no espaço sacrococcígeo para evitar que a fêmea contraia e mova-se, a quantidade vai depender do tamanho do animal e da agitação do mesmo. Com luvas, a mão esquerda é inserida no reto da doadora e a mão direita insere a guia de aspiração na vagina – contendo a agulha e o transdutor -; com a mão esquerda os ovários são localizados e tracionados em direção ao assoalho da vagina onde está posicionado a superfície de contato do transdutor; nesse momento já está sendo visível uma imagem no monitor do ultrassom, onde os folículos aparecem de forma anecóica (preto) e o parênquima de forma ecogênica (cinza claro). Já no local certo, a agulha é introduzida em cada folículo a ser aspirado um por vez, e a guia de punção segue um circuito que terminará em um tubo Falcon aquecido á 37°C com solução DPBS (Solução Salina Tamponada com Fosfato de Dulbecco) que mantém o pH do meio estável entre 7,2 – 7,6, e com heparina que serve para não deixar o conteúdo aspirado coagular, o que, normalmente, é causado pela presença de sangue, prejudicando, assim, o rastreamento dos oócitos. Uma observação é que

durante todo o processo, os tubos devem estar envelopados com papel alumínio, para ser protegidos de raios solares e causar complicações na viabilidade dos oócitos.

Após a aspiração dos folículos, sob uma placa aquecedora á 37°C e preferível dentro de uma capela com fluxo laminar, os oócitos são transferidos para uma placa de Petri para iniciar o rastreamento com o auxílio de uma pipeta e de um microscópio. Nessa etapa, os oócitos que não são desnudos e não estão em atresia irão para uma outra placa de Petri com meio de lavagem (LAV), composto por piruvato de sódio, Soro Fetal Bovino (SBF) e antibiótico gentamicina para serem levados ao laboratório e então selecionados.

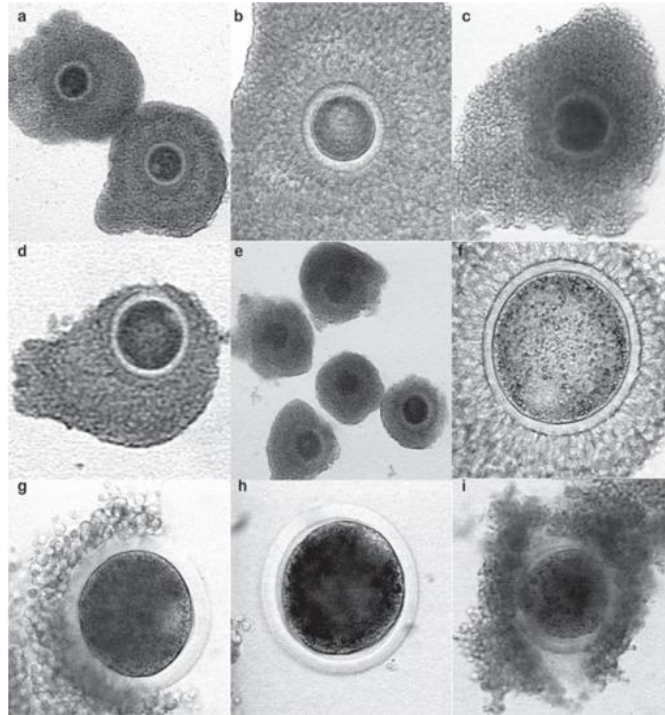
A seleção é feita de acordo com o citoplasma e os complexos *cumulus* baseado na quantidade e na compactação das células, foram então classificados em viáveis e inviáveis e selecionados como grau I, II, III e IV (Figura 2 e Figura 3), sendo os oócitos do último grau descartados devido á atresia (maduros mas com ausência de fecundação), desnudos (não possuir células *cumulus* ao seu redor) e expandidos (maduros).

Figura 2: Rastreamento e Classificação de Oócitos Bovinos

Qualidade	Descrição
Grau I	Oócitos com mais de três camadas de células compactas do <i>cumulus</i> , e citoplasma regular.
Grau II	Oócitos com uma a três camadas de células do <i>cumulus</i> , citoplasma regular ou apresentando granulações finas.
Grau III	Oócitos apresentando menos de três camadas do <i>cumulus</i> ou parcialmente desnudos, citoplasma irregular.
Grau IV	Desnudos (oócitos sem células do <i>cumulus</i>) ou em degeneração (com <i>cumulus</i> expandido e citoplasma heterogêneo apresentando granulações severas).

Fonte: OLIVEIRA, 2014.

Figura 3: Classificação da qualidade dos oócitos bovinos com base na integridade das células do *cumulus* e na aparência do citoplasma. Grau I (a, b, c, e), grau II (d, f), grau III (g), grau IV (h, i)



Fonte: OLIVEIRA, C. S et al, 2014.

3.2.6 Maturação *in Vitro*

Após a seleção, os oócitos eram lavados em meio de maturação (MIV) e transferidos para placas de Petri contendo gotas de 100 μL do mesmo meio, cobertas com óleo mineral. Em seguida, foram encaminhados à estufa incubadora, sob condições de ar e umidade saturada em 95%, com temperatura de 38,5°C e atmosfera contendo 5% de CO_2 , pelo período de 22 a 26 horas.

3.2.7 Fertilização *in Vitro*

A etapa de fecundação, conhecida como Dia 0 (D0), tinha início logo após o período de incubação dos oócitos. Esses foram retirados da placa de Petri anterior e realocados para uma nova placa contendo meio específico para fertilização *in vitro* (FIV), suplementado com heparina e PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina).

O sêmen utilizado no procedimento foi obtido dos proprietários dos animais ou do banco de armazenamento da empresa, sendo ambos congelados. Para sua utilização, foi realizado o descongelamento em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Posteriormente, procedeu-se à avaliação da viabilidade espermática por gradiente de densidade, técnica empregada para separação do plasma seminal por meio de Percoll a 45% e 90%. Em um microtubo tipo Eppendorf, foram adicionadas as camadas de Percoll 90%, Percoll 45% e, por fim, o sêmen descongelado, seguindo essa ordem para garantir a separação das frações.

A amostra foi submetida à centrifugação por 5 minutos a 10.000 rpm para o sêmen convencional e por 4 minutos a 9.000 rpm para o sêmen sexado. Após esse processo, os espermatozoides viáveis se concentraram na parte inferior do tubo, enquanto os espermatozoides mortos permaneceram na camada intermediária e o plasma seminal na camada superior. A fração contendo os espermatozoides viáveis foi retirada com o auxílio de uma pipeta e transferida para a gota na placa de Petri que continha os oócitos maduros. Posteriormente, a placa foi novamente incubada sob as mesmas condições utilizadas no procedimento de maturação *in vitro* (MIV), porém, agora, pelo período de 18 a 22 horas.

3.2.8 Cultivo *in Vitro*

A fase de cultivo, denominada Dia 1 (D1), inicia-se com a remoção dos oócitos da placa contendo o meio de FIV e sua lavagem em meio LAV. Durante esse processo, os possíveis zigotos passaram pelo procedimento de desnudamento, no qual as células do complexo *cúmulus* foram removidas, evitando interferências na absorção de nutrientes essenciais para o desenvolvimento embrionário.

Após a remoção das células, cerca de 30 zigotos foram transferidos para uma nova placa de Petri contendo gotas de meio de cultivo *in vitro* (CIV), composto por soro fetal bovino (SFB), albumina sérica bovina (BSA), glutamina e aminoácidos. Em seguida, as amostras foram incubadas em estufa a 38,5°C, com atmosfera controlada contendo 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂, além de umidade saturada, onde permaneceram por 72 horas.

O desenvolvimento embrionário antes da transferência para a receptora é caracterizado por eventos fundamentais, incluindo a clivagem celular, ativação do genoma embrionário, compactação dos blastômeros, diferenciação entre trofoblasto e embrioblasto, formação e expansão da blastocèle, além da ruptura da zona pelúcida (LONERGAN et al., 1999). Esses processos podem sofrer influência de diversos fatores durante o cultivo *in vitro*, sendo a ativação do genoma embrionário um dos aspectos mais críticos para o desenvolvimento do embrião, ocorrendo entre os estágios de 8 a 16 células.

A fase de clivagem ocorre no Dia 4 (D4), no qual o embrião deve apresentar entre 16 e 24 células. Nessa etapa, 50% do volume do meio de cultivo foi removido de cada gota, e os embriões foram avaliados quanto à divisão celular e formação dos blastômeros e da mórula inicial. Posteriormente, o volume removido foi repostado com meio CIV fresco, e a placa foi incubada por mais 48 horas.

No sexto dia de cultivo (D6), foi realizada a avaliação da taxa de formação de blastocistos, classificados em blastocisto inicial (BI), eclodido (BL) e expandido (BX). O blastocisto expandido é considerado o mais adequado para criopreservação, pois apresenta melhores condições estruturais e maior viabilidade para o desenvolvimento pós-transferência. A classificação morfológica dos embriões seguiu os critérios estabelecidos pela International Embryo Transfer Society (IETS).

Figura 4: Treinamento Pessoal de Cultivo *in vitro*



Fonte: Arquivo Pessoal

3.2.9 Criopreservação de Embriões

No Dia 07 (D7), um dia após a previsão, os embriões são envasados. Existem três técnicas principais de envase:

1. **Embriões a fresco:** Os embriões são apenas colocados em palhetas juntamente com o meio de manutenção composto por BSA e colocados em transportadoras aquecidas até a fazenda.
2. **Congelamento por Direct Transfer (DT):** O embrião produzido *in vitro* é congelado no laboratório por um processo lento, utilizando uma máquina de congelamento por nitrogênio líquido (Figura 5). Todo o procedimento dura aproximadamente 1 hora e 30 minutos até o armazenamento em botijões. O descongelamento ocorre de forma semelhante ao sêmen, com a palheta sendo imersa em um descongelador a 37°C por 30 segundos antes de ser montada no aplicador. Todo esse processo ocorre diretamente no curral.
3. **Criopreservação por vitrificação:** Esse método consiste em um congelamento ultrarrápido, no qual até cinco embriões são colocados diretamente no

nitrogênio líquido. O processo de descongelamento torna-se mais complexo, pois deve ser realizado por um médico veterinário técnico do laboratório. A transferência pode ocorrer na própria fazenda ou no laboratório, com posterior transporte dos embriões em recipientes aquecidos até o local de implantação.

Figura 5: Criopreservação de embriões por técnica DT



Fonte: Arquivo Pessoal

Tanto na técnica de Direct Transfer (DT) quanto na vitrificação, são utilizados crioprotetores para preservar os embriões. No entanto, a vitrificação requer uma maior quantidade desses compostos, o que exige atenção do profissional responsável ao tempo de exposição às soluções crioprotetoras. Um tempo inadequado de mergulho pode levar à desidratação das membranas embrionárias, comprometendo sua viabilidade.

Dentre as técnicas mencionadas, a transferência de embriões a fresco apresenta as maiores taxas de prenhez (48–50%), seguida pela vitrificação (45–49%) e, por último, a DT (30–35%). Essa variação se deve, em grande parte, aos efeitos adversos do congelamento, que podem resultar em danos embrionários antes e após o descongelamento. Entre os principais fatores que afetam a viabilidade dos embriões congelados estão a formação de cristais de gelo, a toxicidade dos crioprotetores, falhas no ajuste da máquina de congelamento e a falta de qualificação do profissional responsável pelo procedimento. Além disso, as taxas de prenhez também são influenciadas por fatores como a qualidade do embrião, o protocolo utilizado, a experiência do veterinário responsável pela transferência e as condições fisiológicas da receptora.

Independentemente da técnica utilizada, apenas embriões de qualidade BX são envasados.

3.2.10 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES E DIAGNÓSTICO GESTACIONAL

Para alcançar taxas satisfatórias de concepção na transferência de embriões, é essencial garantir uma detecção eficiente do cio nas receptoras. Assim como ocorre na inseminação artificial em tempo fixo (IATF), recomenda-se a utilização de protocolos de sincronização para a transferência embrionária em tempo fixo. Esses protocolos minimizam erros na detecção do cio e garantem que a transferência ocorra no momento ideal para maximizar as taxas de sucesso.

No dia da transferência, as receptoras já haviam sido previamente sincronizadas por 17 dias, sendo a transferência realizada no D17. O protocolo de sincronização adotado consistiu nas seguintes etapas:

- **D0:** Implantação do dispositivo intravaginal de progesterona (P4) e aplicação intramuscular de 2 mL de benzoato de estradiol (BE).
- **D8:** Remoção do implante de progesterona e administração intramuscular de 0,5 mL de cipionato de estradiol (ECP), 1,5 mL de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e 2 mL de prostaglandina F2 (PGF2).

Antes da realização da transferência, no D17, cada receptora passa por uma ultrassonografia Doppler para avaliar sua resposta ao protocolo hormonal. Como uma única doadora pode produzir, em média, cinco embriões, recomenda-se sincronizar aproximadamente dez receptoras para garantir que pelo menos sete (cerca de 70%) estejam aptas a receber um embrião.

A transferência embrionária inicia-se com a aplicação de anestesia epidural com 3 mL de lidocaína a 2%. Em seguida, o embrião é carregado no aplicador e depositado no corno uterino ipsilateral ao ovário que apresenta corpo lúteo (CL).

O diagnóstico gestacional é realizado 30 dias após a transferência e repetido aos 90 dias, permitindo a avaliação das taxas de concepção e perdas gestacionais.

3.2.11 PARTO

O avanço das biotecnologias reprodutivas, como a produção *in vitro* e a transferência de embriões, tem resultado no nascimento de animais com alto valor genético e econômico. Dessa forma, garantir assistência adequada ao parto é fundamental para reduzir as taxas de mortalidade neonatal.

A indução do parto é uma técnica utilizada para minimizar complicações tanto para a receptora quanto para o bezerro, especialmente em casos de partos distócicos. Isso ocorre porque os bezerros oriundos de transferência de embriões costumam ser maiores e mais pesados do que os gerados pela raça da receptora. O protocolo adotado para indução baseou-se na administração de:

- **2 mL de prostaglandina F2 (PGF2)(0,5mg)**
- **10 mL de dexametasona (20mg)**, um glicocorticoide de curta ação.

A interação sinérgica entre esses hormônios proporciona resultados positivos na indução do parto. Esse protocolo é aplicado entre 280 e 290 dias de gestação, e a receptora entra em trabalho de parto, em média, dentro de 48 horas. Caso o parto não ocorra dentro de 72 horas, considera-se que o protocolo não foi eficaz e o caso pode evoluir para a necessidade de cesariana. Segundo Barth (2006), esse protocolo apresenta uma taxa de eficácia de 80 a 90% quando utilizado com dexametasona ou flumetasona. No entanto, uma desvantagem importante é a alta incidência de retenção de placenta, que pode atingir 53%, valor significativamente superior ao observado em partos espontâneos.

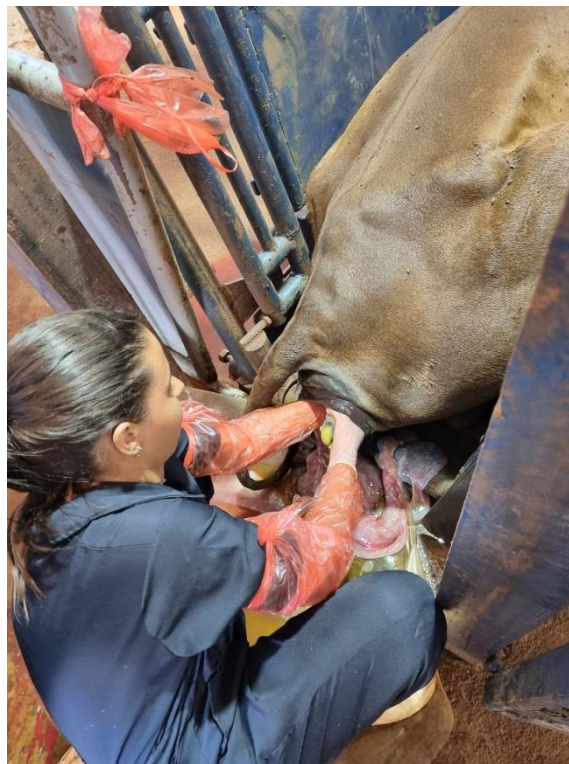
O parto pode ocorrer de três formas:

1. **Natural:** Quando não há necessidade de intervenção.
2. **Natural auxiliado:** Quando há assistência, mas sem necessidade de cirurgia.
3. **Cesárea:** Indicada em casos de distocia severa, fetos de grande porte, falha na dilatação cervical da vaca ou outras condições específicas.

A cesárea é realizada no tronco tombador da sala de cirurgia, por meio de uma incisão na região paramamária esquerda. Após a retirada do bezerro, são adotadas medidas para garantir sua sobrevivência, incluindo:

- **Oxigenoterapia:** Para auxiliar na respiração e eliminar fluidos pulmonares.
- **Estimulação física:** O bezerro pode ser erguido pelos membros pélvicos para facilitar a drenagem de líquidos ou submetido a fricção torácica com toalhas.
- **Administração de fármacos:** Caso o bezerro não inicie a respiração espontaneamente dentro de 30 segundos, ele pode estar em apneia primária. Nesse caso, recomenda-se a administração intravenosa de 1 mL de cloridrato de doxapram para estimular a respiração.
- **Controle térmico:** O bezerro deve ser posicionado em decúbito esternal e coberto com mantas para prevenir hipotermia.

Figura 6: Parto Natural Auxiliado



Fonte: Arquivo Pessoal

Ao final da cirurgia, o bezerro é encaminhado para a Unidade de Terapia Intensiva (UTI) neonatal, onde é realizado o procedimento cirúrgico do umbigo. Durante esse processo, são identificadas duas artérias umbilicais, duas veias umbilicais e o úraco, estruturas que devem ser ligadas com fio poligalactina 910 (vicryl) e seccionadas, permitindo que se retraiam em

direção ao abdômen. Por fim, a pele do umbigo é suturada com fio de nylon para garantir o fechamento adequado.

Bezerros nascidos por parto natural ou auxiliado não necessitam desse procedimento, pois, ao atravessar o canal vaginal, suas estruturas umbilicais se colabam e rompem naturalmente. Nesses casos, apenas a cura do umbigo é realizada nos dias subsequentes para prevenir infecções.

Após a cirurgia, o bezerro é transferido para a baia de observação na UTI, onde recebe colostro imediatamente por meio de mamadeira, com um volume aproximado de 2 litros de colostro em pó diluído em água morna, quantidade que varia conforme tamanho do bezerro. Caso o bezerro não apresente reflexo de sucção adequado, recomenda-se a utilização de sondagem esofágica para garantir o aleitamento. O colostro em pó é administrado duas vezes ao dia durante os dois primeiros dias de vida. No terceiro dia, caso o bezerro esteja apto, ele é transferido para o bezerreiro em baia individual, passando a ser alimentado diretamente na vaca.

3.2.12 ROTINA DA CLÍNICA NEONATAL

Na rotina da clínica neonatal, todos os bezerros passam por exame clínico duas vezes ao dia, pela manhã e à tarde. O exame inclui a aferição dos seguintes parâmetros:

- Frequência respiratória
- Frequência cardíaca
- Temperatura corporal
- Coloração das mucosas
- Turgor cutâneo

O Quadro 1 apresenta os valores de referência utilizados para monitoramento desses parâmetros, garantindo a identificação precoce de qualquer alteração no estado clínico dos bezerros.

Quadro 1: Monitoramento de parâmetros.

	Frequência respiratória	Frequência cardíaca	Temperatura corporal	Coloração de mucosas	Turgor cutâneo
Normal	24 a 36	80 a 120	38.1 a 39.5	Rósea	1 a 2

Após o nascimento do bezerro, são realizados alguns tratamentos preventivos para garantir sua saúde e desenvolvimento adequado. Entre as medidas adotadas, incluem-se:

- Ferro associado à vitamina B12: auxilia na prevenção e/ou tratamento da anemia e também no combate à tristeza parasitária bovina.
- Complexo de vitaminas ADE: fundamental para o crescimento e ganho de peso do animal.
- Halofuginona: atua na prevenção e controle da diarreia causada pelo *Cryptosporidium parvum*.
- Cloridrato de levamisol: anti-helmíntico indicado para a prevenção e o tratamento de verminoses gastrointestinais e pulmonares.
- Hemolitan®: suplemento vitamínico e mineral que contribui para a melhoria da condição nutricional do bezerro.
- Glicopan®: combinação de aminoácidos que estimula o apetite e o ganho de massa corporal.

Essas medidas são essenciais para fortalecer o sistema imunológico dos bezerros, reduzir a incidência de doenças e promover um crescimento saudável, conforme o Quadro 2.

Quadro 2: Tratamento dos bezerros

	Ferro + B12	ADE	Halofuginon a	Cloridrato de levamisol	Hemolitan®	Glicopan®
Dosagem	2 ml – 1M	2ml – IM	8ml – oral	5 ml - oral	5ml - oral	5ml – oral
Intervalo	A cada 7 dias	A cada 15 dias	1 vez por dia por 7 dias	Dose única	Diariamente até momento	Diariamente até momento

					da entrega ao proprietário	da entrega ao proprietário
--	--	--	--	--	-------------------------------	-------------------------------

A cura do umbigo do bezerro é realizada logo após o nascimento para prevenir infecções e garantir uma cicatrização adequada. Em bezerros nascidos por parto natural, o umbigo é imerso em solução de iodo a 10% puro por cinco minutos no momento do nascimento. Nos dias seguintes, a solução pode ser diluída em soro fisiológico e aplicada por dois minutos diários até a queda completa do umbigo, que ocorre entre cinco e seis dias. Já para os bezerros nascidos por cesariana, o procedimento inclui a aplicação diária de *Ganadol*®, uma pomada cicatrizante composta por ureia, penicilina e dihidroestreptomicina, até a retirada dos pontos, que acontece no sétimo dia de vida. Esses cuidados são fundamentais para evitar a onfalite, uma inflamação das estruturas umbilicais, como as artérias umbilicais (onfaloarterite), as veias umbilicais (onfaloflebite) e o úraco (onfalouraquite). Caso não tratada, a infecção pode se disseminar pela corrente sanguínea, afetando outros órgãos e comprometendo a saúde do animal.

O desmame dos bezerros tem início aos 60 dias de vida, quando a alimentação é reduzida de duas amamentações para apenas uma ao dia. No entanto, já na segunda semana de vida, eles começam a receber feno e ração peletizada à vontade, garantindo uma transição alimentar adequada. Além disso, após o aleitamento matinal, os bezerros são soltos diariamente em um piquete com capim Braquiária, permitindo que se adaptem ao ambiente e socializem com os outros animais.

Entre as doenças mais frequentes na clínica de bezerros, destacam-se as diarreias, a tristeza parasitária bovina e as pneumonias. Essas enfermidades exigem monitoramento constante e protocolos de manejo específicos para garantir o desenvolvimento saudável dos animais.

Figura 7: Nebulização em bezerra com pneumonia.



Fonte: Arquivo Pessoal

As diarreias podem ocorrer até por volta de 30 dias de idade do bezerro, e os principais patógenos são rotavírus, coronavírus, *Salmonella* spp., patotipos de *Escherichia coli* e *Cryptosporidium* spp.. Deve-se realizar um antibiograma para saber qual melhor escolha de fármacos para o tratamento. Uma das principais consequências da diarreia é acidose metabólica, que se caracteriza pela deficiência primária dos níveis de bicarbonato. Essa diminuição é, em grande parte, resultante do aumento da perda intestinal e da elevação da concentração sérica de íons hidrogênio (H^+). Portanto para um tratamento de amplo espectro é utilizado um antibiótico á base de sulfametoxazol e trimetoprim associado ao ceftiofur e meloxicam (anti-inflamatório não esteroide) e 2 litros de solução enteral oral para reestabelecer a hidratação (sódio, cloro, fluidos) e reversão da acidose (bicarbonato de sódio) e valores energéticos (glicose). Em casos mais severos de desidratação optar também por fluidoterapia.

Entre as doenças respiratórias mais comuns, está a broncopneumonia bacteriana, onde os principais sinais são respiração acelerada, secreção nasal, febre, estertores na auscultação e

tosse. Para o tratamento é feito o uso de antibiótico enrofloxacina associado com nebulização duas vezes ao dia com óleo canforado, acetilcisteína, bromexina e dexametasona.

A tristeza parasitária bovina é outra doença comumente dada em bezerros, causada principalmente, pela bactéria (ricketsia?) *Anaplasma marginale* e pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, sendo os três agentes transmitidos pelo carrapato, aqui no Brasil, *Rhipicephalus microplus*. Para o diagnóstico, é possível observar pelos sinais clínicos característicos da doença (anaplasmosose ou babesiose) juntamente com o esfregaço sanguíneo levado ao microscópio. O tratamento da anaplasmosose é indicado o cloridrato de oxitretaciclina ou enrofloxacina e para babesiose o acetato de diminazeno, as terapias de suporte são feitas de acordo com os demais sinais clínicos e quadro clínico do animal.

Os bezerros de clones são entregues aos proprietários a partir de 4 meses de idade levando em consideração de estarem completamente saudáveis. São entregues desmamados, vermifugados e vacinados contra raiva, brucelose, clostridioses, e doenças respiratórias (vírus sincicial bovino (BRSV), rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e parainfluenza (PI3)).

Nos casos em que o bezerro vinha à óbito, era realizado a necropsia. Em quase todos os bezerros era observado os mesmos padrões de anomalias, como por exemplo, hipotrofia ou hipertrofia cardíaca, hepatomegalia, úlceras, petéquias em órgãos, entre outros.

3.2.13 Pós-operatório das Receptoras

As receptoras que eram submetidas a cesárea, eram denominadas de hospital. Todos os dias na parte da tarde elas eram trazidas ao curral principal para realizar o manejo de ferida e medicações (Figura 9). As feridas eram lavadas com água corrente e clorexidina a 2%; a avaliação da ferida era feita e tomados os possíveis procedimentos. No geral, animais com até 5 dias de hospital era medicado com 20ml de Gentopen® IM; nas feridas optava-se por passar uma mistura de pomada composta por unguento, terramicina em pó, iodopolividona a 10% e açúcar, por cima aplicava spray prata. Era avaliado também se a receptora não possuía retenção de placenta, quadro bastante comum. Se observado era feito 2ml de prostaglandina com intervalos de 48 horas até a expulsão do conteúdo.

Figura 8: Manejo com comprometimento de ferida de cesárea



Fonte: Arquivo Pessoal

Os pontos da sutura são retirados por volta do 10º dia pós cesárea, a depender da situação da ferida.

Receptoras de embriões que tiveram parto natural ou parto auxiliado também eram transferidas para o hospital para ficarem em observação, principalmente na questão de retenção de placenta.

3.3 Resumo quantitativo das Atividades

Descrição de Atividades	Quantidade de vezes
Isolamento de células	3
Aspiração Folicular (OPU)	2
Rastreamento de oócitos	13
Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	17

Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	16
Criopreservação Direct Transfer (DT)	8
Criopreservação Vitrificação	11
Transferência de embriões	4
Diagnóstico gestacional	4
Parto natural	2
Parto auxiliado	4
Cesárea	12
Necropsia	4

4 DIFICULDADES VIVENCIADAS

Apesar da empresa onde eu realizei o estágio ser um local onde eu já havia ido diversas vezes acompanhar serviços terceirizados, antes de iniciar o primeiro dia eu estava bastante insegura, pois é uma empresa muito influente na sua área, e de certa forma eu iria acompanhar rotinas que nunca tinha vivenciado antes: a produção de clones bovinos.

A maior dificuldade que enfrentei durante o período de estágio foi na área de clínica médica de neonatos, nunca tive muito conhecimento prático nesse seguimento da bovinocultura e precisei de muita ajuda tanto da estagiária residente e da médica veterinária trainee quanto do médico veterinário responsável pelo setor da fazenda. Em relação ao laboratório, li muito a respeito de clonagem antes de adentrar na Geneal, basicamente a teoria estava fresca na memória, e a parte prática fui aprendendo com o passar dos dias que se seguiram, mas não deixou de ser algo que tive dificuldade também, pois todo o processo da clonagem é bastante complexo e desafiador.

No geral, foi mais uma questão de tempo para o medo e a insegurança desaparecer, pois fui me adaptando aos poucos com as atividades desenvolvidas e aprendi bastante.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio curricular na Geneal – Genética e Biotecnologia Animal foi de grande aprendizado para mim no âmbito profissional colecionando experiências e aperfeiçoando conhecimento, de forma também pessoal. É uma empresa que sempre admirei seu potencial e não me imaginava passando três meses basicamente de treinamento para minha carreira como futura médica veterinária. Tive a oportunidade de conhecer nomes importante da área do melhoramento genético e conviver com eles absorvendo conteúdo e experiência.

Basicamente o estágio curricular tem o objetivo de ajudar a moldar um indivíduo frente ao início de sua carreira profissional, desenvolvendo relações e criando responsabilidades.

CAPÍTULO 2

CLONAGEM BOVINA PELA TÉCNICA CONVENCIONAL DE TRANSFERÊNCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS (TNCS)

Florence Vitoria Sousa Resende ¹, Jair Alves Ferreira Junior ².

¹ Discente do curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí.

florencevittoria@gmail.com

² Médico Veterinário, professor do curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí.

jair.ferreira@ifgoiano.edu.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho é informar aspectos sobre a clonagem em bovinos e sua técnica mais comum: a técnica convencional de transferência nuclear de células somáticas. A clonagem é um processo altamente avançado do melhoramento genético e da biotecnologia que é capaz de criar um indivíduo idêntico genotipicamente ao outro a partir de células somáticas, pela reprodução assexuada. No contexto da pecuária esse procedimento é agregado a animais com alto valor genético e financeiro, o que implicaria na disseminação de genes de interesse no rebanho comercial. Entre essas biotécnicas está a transferência nuclear por célula somática (TNCS) que consiste na enucleação de um oócito e a substituição por um núcleo de uma célula somática do animal a ser clonado em questão. O objetivo dessa técnica é a propagação da cópia genética de um animal que possui características desejáveis e outras qualidades econômicas para o setor de pecuária. Para a ética e o bem-estar animal, a clonagem sempre gerou implicações bem como os obstáculos que todo o processo enfrenta antes de chegar ao resultado final, como a baixa porcentagem de sucesso e os possíveis problemas de saúde que os clones enfrentam até chegarem a fase adulta.

Palavras-chave: biotecnologia, melhoramento genético, clonagem, TNCS, enucleação, célula somática.

ABSTRACT

The objective of this paper is to inform aspects of cloning in cattle and its most common technique: the conventional technique of nuclear transfer by somatic cells. Cloning is a highly advanced process of genetic improvement and biotechnology that is capable of creating an individual genotypically identical to another from somatic cells, through asexual reproduction. In the context of livestock farming, this procedure is associated with animals with some genetic and financial value, which would imply the dissemination of genes of interest in the commercial herd. One of these biotechniques is somatic cell nuclear transfer (SCNT), which consists of the enucleation of an oocyte and its replacement by a nucleus of a somatic cell of the animal to be cloned in question. The objective of this technique is to propagate the genetic copy of an animal that has desirable characteristics and other economic qualities for the livestock sector. For ethics and animal welfare, cloning has always generated implications as well as the obstacles that the entire process faces before reaching the final result, such as the low success rate and the possible health problems that clones face until they reach adulthood.

Keywords: biotechnology, genetic improvement, cloning, NCST, enucleation, somatic cell.

IMPORTÂNCIA E RELEVÂNCIA

Clone é um termo que se origina da palavra grega "klon", a qual se traduz como galho ou broto.

A clonagem de animais é uma biotecnologia da reprodução que é estudada há várias décadas por cientistas, com os primeiros experimentos relacionados à clonagem registrados no século XIX, sendo que somente em 1996 houve sucesso na clonagem do primeiro mamífero na Escócia, a ovelha Dolly por transferência nuclear de células somáticas. No Brasil o primeiro clone de sucesso foi a bezerra da raça simental nomeada Vitória da Embrapa, que viveu 10 anos e teve duas gestações durante sua vida: Glória e Galante, provando que ela foi um clone perfeito do ponto de vista científico e de produção.

A técnica de clonagem mais comum atualmente é a clonagem por transferência nuclear de célula somática (TNCS). Esta abordagem emprega oócitos sem núcleo como citoplasma receptor (citoplasto) e células com núcleo como doadoras do núcleo (carioplasto). Após a reconstrução e ativação, o embrião resultante é transferido para uma receptora, que dará continuidade à gestação. Apesar de a técnica inovadora e revolucionária há vários relatos sobre os problemas associados à clonagem. Em comparação com outras biotécnicas reprodutivas, as taxas de perda embrionária, fetal e neonatal são superiores, o que leva a uma redução na porcentagem de eficiência, tornando a técnica com custo elevado.

Em relação à aplicabilidade da clonagem, existem várias áreas que podem se beneficiar dessa técnica de biotecnologia reprodutiva. Entre essas áreas, destacam-se: a conservação de espécies animais em risco de extinção, a replicação de animais de produção com características fenotípicas e/ou genotípicas desejáveis (BORDIGNON, 2017). A clonagem de animais destinados à produção está predominantemente associada à reprodução de indivíduos que apresentam fenótipo e/ou genótipo desejáveis, considerados como exemplares de elite. Entre as características produtivas que são valorizadas nessa seleção, destacam-se: alta produtividade leiteira, maior percentual de proteína no leite, eficiência alimentar aprimorada, taxa de crescimento acelerada, qualidades específicas da carne (como maciez e marmoreio) e resistência a doenças. Esses aspectos são economicamente significativos na produção de alimentos de origem animal (BORDIGNON, 2017). Além disso, a clonagem de animais de fazenda pode estar ligada à conservação e à propagação de genomas valiosos. Isso indica que, por meio da produção *in vitro* de clones e sua criopreservação, é viável criar cópias de animais a qualquer momento no futuro, como, por exemplo, recuperar genomas que não estão disponíveis em uma população específica.

Figura 1: Primeira imagem do clone da vaca nelore Viatina-19 FIV Mara Móveis



Fonte: G1. 2025.

Apesar das diversas vantagens oferecidas pela clonagem, persistem questões éticas relacionadas a essa técnica, uma vez que uma parcela da população vê a clonagem de animais como algo imoral (FIESTER, 2005), e além disso, há também preocupações ligadas ao bem-estar dos animais envolvidos em qualquer etapa do processo de clonagem. O propósito deste estudo foi conduzir uma abordagem acerca de diversos aspectos relacionados à clonagem de bovinos. Com um foco informativo, o trabalho visa contribuir para a compreensão desse tema oferecendo uma análise fisiológica abordando todas as etapas da clonagem desde as técnicas laboratoriais até os cuidados dos indivíduos clonados, levantando questões sobre bem-estar animal e aplicabilidade na sociedade.

ETAPAS DA CLONAGEM POR TNCS

1. Obtenção e Maturação dos Oócitos

Na espécie bovina, os citoplastos geralmente são derivados de oócitos que são obtidos por meio da aspiração folicular de ovários oriundos de abatedouros, essa é a técnica que especialistas recomendam por questões de viabilidade e custos. Esses oócitos passam por um processo de maturação in vitro (MIV) e, posteriormente, são submetidos à enucleação.

Os ovários obtidos devem ser mantidos em solução salina e a uma temperatura constante entre 25 e 30°C. A aspiração folicular deve ocorrer com folículos que apresentem um diâmetro superior a 3 mm, coletando os complexos cumulus-oócito (CCOs), que contêm oócitos imaturos (Figura 2). Após a identificação, os CCOs são selecionados com base em características morfológicas tanto dos oócitos quanto das células do *cumulus*. Para realizar a clonagem, é essencial que os oócitos contendo maduros, isto é, que alcancem a metáfase da meiose II (MII), que se caracteriza pela presença do corpúsculo polar no espaço perivitelino. Para isso, os CCOs são suspensos em um meio de maturação *in vitro* (MIV), composto por um meio de cultivo de tecidos (TCM-199) modificado, enriquecido com soro fetal bovino (FBS), albumina sérica bovina (BSA), hormônio folículo-estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), 17- β -estradiol e vários fatores de crescimento como fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-I), além de piruvato de sódio e antibióticos. Os CCOs são colocados em gotas desse meio de maturação, cobertos com óleo mineral, e permanecem em incubadora sob uma atmosfera úmida composta por 5% de CO₂ e 95% de ar, na temperatura de 38,5°C. O período da MIV varia conforme a espécie: é de 20 a 24 horas para ruminantes (bovinos, ovinos e caprinos), 24 a 36 horas para equinos e entre 42 e 46 horas para suínos. Após o MIV, as células do cumulus são removidas mecanicamente através da pipetagem ou por métodos enzimáticos utilizando um agitador vortex com uma solução tamponada contendo hialuronidase a 0,1%. Após o desnudamento, os oócitos são selecionados com base na presença do corpúsculo polar extrusado e sua morfologia (BORDIGNON, 2017). Durante a maturação, os oócitos passam por uma reorganização e redistribuição notável de suas organelas, além de adquirirem um conjunto de moléculas sinalizadoras. Esse conjunto de transformações capacita o oócito a concluir a meiose após a fecundação ou reconstrução e ativação no caso da clonagem, possibilitando assim o desenvolvimento embrionário.

Figura 2: a e b oócitos imaturos, c e d oócitos maduros. Nota-se a ampliação das células do *cumulus* no CCO maturado (c) e a presença do corpúsculo polar extrusado no oócito maduro

(d), indicado pela seta na imagem



Fonte: adaptado de BORDIGNON (2017, p. 3).

2. Preparação dos Citoplastos

Ao término da MIV, a próxima etapa do protocolo de clonagem envolve a enucleação dos oócitos, que consiste na remoção do material genético desses gametas. Para realizar esse procedimento, existem várias técnicas disponíveis, que podem ser realizadas tanto com a presença quanto sem a zona pelúcida (ZP), como já indicado. Essas técnicas incluem o uso de micromanipuladores ou métodos manuais (HMC), além de abordagens mecânicas ou químicas para enucleação, podendo ainda envolver assistência por fluorescência ou não. A técnica que laboratórios especializados utilizam é a convencional (Figura 4). Com a retirada do material genético, esse oócito passa a ser chamado de citoplasto, que se refere a uma estrutura composta exclusivamente por citoplasma. No entanto, ele ainda manterá o material genético mitocondrial (WELLS, 2005).

3. Preparação e Cultivo das Células Doadoras de Núcleo

De acordo com a técnica proposta por Bordignon (2017), a clonagem a partir de células somáticas é realizada especialmente com exames celulares obtidos de biópsias de tecidos

animais. Entre eles, os fibroblastos dérmicos são frequentemente escolhidos para a clonagem de animais de produção, uma vez que é simples obter uma biópsia da pele em animais vivos. Então, estes fibroblastos são extraídos de uma biópsia óssea estéril, com dimensões de 1-2 cm², após a realização da tricotomia e da assepsia da área onde será feita a coleta. Uma amostra de tecido é submetida a várias lavagens, e a epiderme é retirada com uma lâmina de bisturi estéril. O restante do tecido é então cortado em fragmentos de 3-4 mm e transferido para o meio de cultivo. Essas células são mantidas em cultura e por fim criopreservadas e armazenadas em nitrogênio líquido.

4. Reconstrução Embrionária

A reconstrução do embrião envolve a introdução da célula doadora, conhecida como carioplasto, no espaço perivitelino de um oócito enucleado, que é denominado citoplasto. Esse procedimento é normalmente realizado por meio de micromanipulação (HEYMAN, 2005). Para garantir a fusão suave das membranas da célula doadora e do oócito enucleado, são aplicados um ou mais pulsos elétricos de corrente contínua utilizando um sistema de eletroporação (BORDIGNON, 2017).

Em uma câmara de eletrofusão conectada ao eletroporador (Figura 3) é colocado cerca cinco a dez estruturas em meio de eletrofusão composto por sulfato de magnésio, manitol, BSA, pH 7,2-7,4, etc. O meio de fusão é definido como uma solução com baixa condutividade, cuja função é proteger o embrião reconstruído de possíveis danos durante a aplicação de correntes elétricas. O procedimento é iniciado com o pré-pulso de corrente alternada (5-6 V; 600-1000 kHz; 5-10 µs), depois é feito mais um impulso, ou mais, com corrente elétrica contínua (1-3,5 kV cm⁻¹; 30-250 µs) para estimular o processo de poração das membranas celulares e fusão.

Figura 3: Aparelho de eletrofusão e eletroporação



Fonte: The Lab World Group (2025)

5. Ativação Oocitária

Na clonagem, não acontece a fecundação do oócito por um espermatozoide, portanto desenvolveram maneiras a ativação artificial dos gametas para minimizar as oscilações da concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{2+}]_i$) (WAKAI, ITO; FISSORE, 2014).

Um método amplamente utilizado para a ativação *in vitro* dos oócitos envolve a exposição dos gametas ao etanol ou a ionóforos de Ca^{2+} , como A23187 e ionomicina (IO). Esses agentes provocam um aumento inicial e persistente nos níveis de $[Ca^{2+}]_i$, sinal que é suficiente para iniciar a ativação do oócito. Além disso, são incorporados ao meio substâncias que atuam por várias horas após a exposição aos ionóforos, como inibidores da síntese proteica, por exemplo, ciclohexamida (CHX), e/ou inibidores de quinases, como dimetilaminopurina (6-DMAP). A elevada atividade do MPF pode levar à condensação da cromatina, estabilização do fuso meiótico e manutenção dos oócitos em fase MII. A adição desses compostos (CHX e 6-DMAP) ao meio de ativação visa aumentar os níveis de $[Ca^{2+}]_i$, facilitando assim a degradação do MPF. Outra abordagem para a ativação consiste na aplicação de pulsos elétricos; neste caso, também se recomenda o uso de inibidores proteicos. A técnica que combina fusão e ativação simultaneamente pode ser realizada através da eletroporação, onde os pulsos de corrente contínua promovem a fusão das membranas e servem como estímulo inicial para a ativação do oócito. No entanto, é importante notar que o meio utilizado para fusão geralmente possui baixas concentrações de cálcio, o que pode não ser eficaz na degradação do MPF.

Erros no processo de ativação oocitária podem resultar em interações anormais entre o núcleo e o citoplasma e danos à integridade da cromatina, além de dificultar e/ou impedir o desenvolvimento embrionário, por isso esse procedimento se torna uma etapa crucial para uma clonagem de sucesso (BORDIGNON, 2017).

Considerando a complexidade do processo de fecundação e o início do desenvolvimento embrionário, é quase um milagre que a técnica de transferência nuclear, que envolve a introdução significativa de uma célula somática, possa gerar embriões, fetos e seres viáveis. Este fenômeno evidencia a adaptabilidade da natureza (VAJTA et al., 2006).

6. Cultivo dos Embriões

Ao término da fusão e ativação, os embriões reconstruídos são introduzidos em cultivo *in vitro* (CIV). Para esse processo, existem diversos sistemas de cultivo disponíveis, que são comumente empregados para o desenvolvimento *in vitro* (FIV) dos embriões (HEYMAN, 2005; WELLS, 2005) (Figura 4). Porém a maneira de cultivo definidas para os embriões obtidos por FIV parecem não ser tão eficazes no desenvolvimento de embriões de clones (GARDNER et al., 2014). O autor ressalta que a pesquisa está predominantemente voltada para a compreensão da expressão gênica dos clones, enquanto a fisiologia desses organismos recebe menos atenção. Assim, durante a fase de CIV, há escassez de informações sobre a nutrição e o metabolismo dos embriões clonados. Embriões resultantes da clonagem por TNCS apresentam um perfil proteico distinto em comparação aos embriões originados pela fecundação *in vivo*. Isso se deve ao fato de que o núcleo da célula somática pode ativar genes que geralmente permanecem inativos nos blastômeros de embriões em estágios iniciais de desenvolvimento. Essas alterações no proteoma são provavelmente responsáveis pelas mudanças no metabolismo dos embriões clonados, o que, por sua vez, gera a necessidade de requisitos diferentes para seu cultivo.

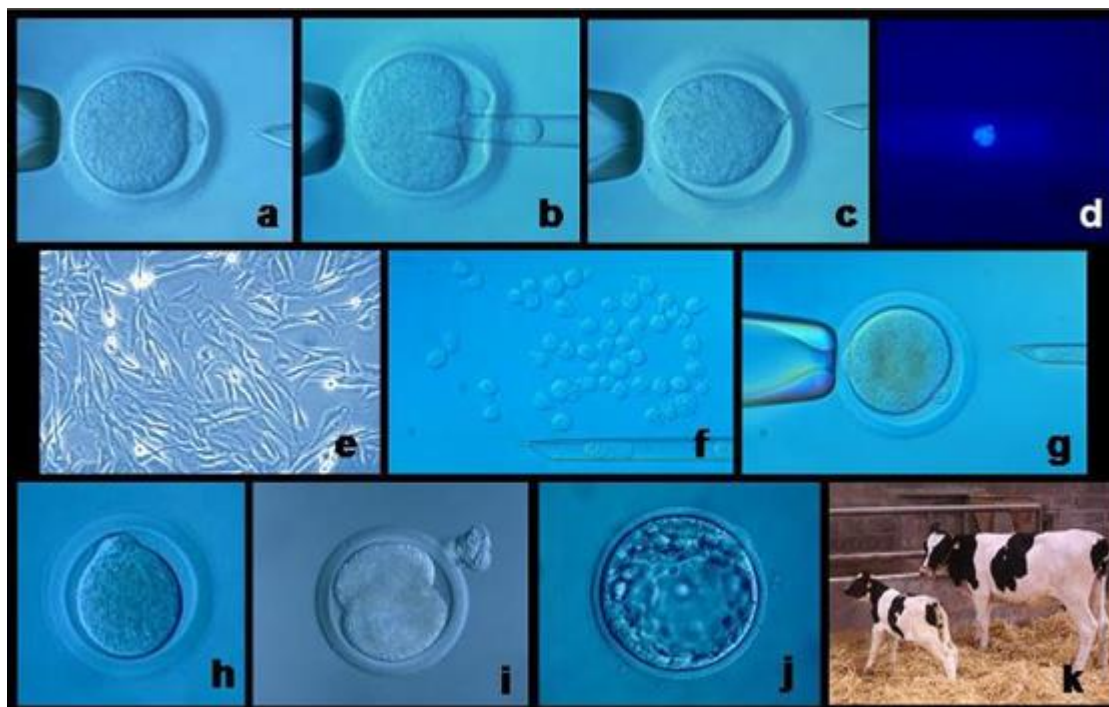
Para garantir um desenvolvimento embrionário eficaz no CIV, é necessário adicionar ao meio, substâncias que promovam o crescimento celular, como por exemplo, BSA, FBS e vitaminas.

O CIV pode ser realizado em placas contendo gotas de meio, onde um embrião é inserido em cada gota, ou em micropoços utilizando o sistema WOW. Em ambas as abordagens, o meio é protegido por uma camada de óleo mineral e mantido em incubação a 38,5°C, sob uma atmosfera composta por 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂. Os embriões permanecem no

cultivo (7-8 dias) até o momento da transferência (SHAH et al., 2008) ou passa pelo procedimento de vitrificação.

Após a obtenção do embrião vitrificado segue-se a técnica convencional de transferência de embrião, obtenção de uma doadora apta e acompanhamento da gestação, parto e cuidados neonatais.

Figura 4: Passo a passo da técnica convencional de clonagem por TNCS. **a)** oócito maturado e desnudo antes da enucleação; **b)** aspiração do corpúsculo polar contendo o material genético; **c)** oócito enucleado; **d)** material genético corado; **e)** cultivo celular de fibroblasto por isolamento; **f)** fibroblasto já isolado; **g)** inserção da célula doadora proveniente do fibroblasto sob a ZP do oócito enucleado; **h)** célula fusionada; **i)** clivagem do embrião; **j)** blastocisto desenvolvido; **k)** bezerro do clone.



Fonte: CHAVATTE-PALMER et al., 2014

ÉTICA E BEM-ESTAR ANIMAL NA CLONAGEM

Os animais resultantes da clonagem podem apresentar diversas complicações em distintos sistemas do corpo devido a possibilidade de alterações da multiplicação celular no processo de transferência nuclear. Essas anomalias, que podem surgir em várias fases da vida do animal, levantam preocupações sobre a qualidade de vida, saúde e bem-estar dos clones. Se tratando

das receptoras, é levantado argumentos em relação ao tamanho dos bezerros, já que em clones cerca de 30% deles possuem tamanho maior que o normal e gera complicações no momento do parto ou as vezes é necessário intervenções no parto (IBTISHAM et al., 2016).

A clonagem é uma biotécnica que acarreta várias controvérsias no quesito da ética, e pode ser vista por muitos de maneira negativa em relação à vida, pois temem que, com a facilidade de duplicar seres vivos, ela se torne desvalorizada e perca o seu respeito. Esses aspectos de medo ou esperança intensa não podem ser ignorados; no entanto, é fundamental que as discussões sobre este tema se baseiem em evidências concretas, tanto científicas quanto sociais (GREEN, 2002), já que o resultado de uma falta de conhecimento e de informações incorretas que faz com que se acredite que indivíduos com o mesmo genótipo serão iguais.

É necessário estabelecer restrições para a aplicação da engenharia genética, levando em consideração tanto a perspectiva de especialistas do setor quanto a opinião pública, que exerce uma influência significativa. Essa situação ressalta a relevância da participação dos veterinários nas discussões sobre o tema, uma vez que eles são profissionais de saúde com expertise em saúde animal.

No Brasil, a Lei nº 11.105, sancionada em 24 de março de 2005, estabelece em seu Artigo 6º a proibição da clonagem humana e de práticas de engenharia genética que envolvem células germinativas, zigotos e embriões humanos. Tais procedimentos são autorizados apenas para animais não-humanos (BRASIL, 2005).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A clonagem animal é uma biotecnologia reprodutiva que tem múltiplas aplicações em pesquisa, melhoramento genético, reprodução animal e até mesmo na medicina humana. A técnica de TNCS é complexa, o que torna necessário uma atenção bastante especial para desenvolver embriões viáveis. Este método também requer manipuladores treinados. Embora a clonagem ofereça diversos benefícios, esta técnica levanta questões éticas e morais, além de estar em desacordo com algumas ideologias da população e princípios de bem-estar animal. No entanto, quando feitas corretamente, essas técnicas podem ter inúmeras aplicações para melhorar a produção animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTH, A.D. **Induced parturition in cattle**. Rounds of Department of Large Animals Clinical Sciences of the Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan.

BORDIGNON, V. **Animal cloning – state of the art and applications**. Reference Module in Life Sciences. Montreal, Canada, 2017.

BRASIL. Lei nº 11.105 de 24 de março de 2005. Regulamenta os incisos II, IV e V do par. 1º do Art. 225 da Constituição Federal, estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados, cria o Conselho Nacional de Biossegurança – CNBS, reestrutura a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CNTBio, dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB, revoga a Lei nº 8.974, de 5 de janeiro de 1995, e a medida provisória nº 2.191-9, de 23 de agosto de 2001, e os Arts. 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10º e 10º da Lei nº 10.814, de 15 de dezembro de 2003, e dá outras providências. Diário Oficial da União: capítulo 1, [S. l.], 24 mar. 2005. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/l11105.htm. Acesso em: 26 de fevereiro de 2025.

CHAVATTE-PALMER, P. et al. **Pregnancy and neonatal care of SCNT animals**. In: CIBELLI, J. et al. Principles of Cloning. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2014. p. 107-12.

FIESTER, A. **Ethical issues in animal cloning**. Perspectives in Biology and Medicine. Philadelphia, United States of America, v. 48, n. 3, p. 328-343, 2005.

GARDNER, D. K.; LANE, M. **Culture of viable mammalian embryos in vitro**. In: CIBELLI, J. et al. Principles of Cloning. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2014. p. 63-79.

GLOBO RURAL. **Nasce o primeiro clone de Viatina, a segunda vaca mais cara do mundo**. *Globo Rural*, 2025. Disponível em <https://globorural.globo.com/pecuaria/boi/noticia/2025/01/nasce-o-primeiro-clone-de-viatina-a-segunda-vaca-mais-cara-do-mundo.ghtml>. Acesso em: 07 mar. 2025.

GREEN, R. M. **Ethical implications of cloning**. In: CIBELLI, J. et al. Principles of Cloning. 1. ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 477-493.

HEYMAN, Y. **Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle**. Reproduction Nutrition Development. Jouy-en-Josas, France, v. 45, p. 353-361, 2005.

IBTISHAM, F. et al. **Animal cloning applications and issues**. Russian Journal of Genetics. Zhanjiang, China, v. 53, n. 9, p. 965-971, 2016.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F.; RIEGER, D.; HUMBLLOT, P.; BOLAND, M. P. **Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos**. J. Reprod. Fertil., v. 117, p. 159-167, 1999.

OLIVEIRA, C. S.; SERAPIÃO, R. V.; QUINTÃO, C. C. R. **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. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 175). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1015853>. Acesso em: 7 mar. 2025.

PAGE, R. L. **Micromanipulation techniques for cloning**. In: CIBELLI, J. et al. Principles of Cloning. 1. ed. San Diego: Academic Press, 2002. p. 155-173.

PONTES, J. H. F.; MELO STERZA, F. A.; BASSO, A. C.; FERREIRA, C. R.; SANCHES, B. V.; RUBIN, K. C. P.; SENEDA, M. M. **Ovum pick-up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (Bos indicus) donors**. Theriogenology, v. 75, n. 1640-1646, 2011.

SHAH, R. A. et al. **Hand-made cloned buffalo (Bubalus bubalis) embryos: comparison of different media and culture systems**. Cloning and Stem Cells. Karnal, India, v. 10, n. 4, p. 435-442, 2008.

VAJTA, G.; GJERRIS, M. **Science and technology of farm animal cloning: State of the art**. Animal Reproduction Science. Tjele, Denmark, v. 92, p. 211-230, Jan. 2006.

WAKAI, T.; ITO, J.; FISSORE, R. A. **Artificial activation of mammalian oocytes for cloning: present status and future perspectives**. In: CIBELLI, J. et al. Principles of Cloning. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2014. p. 3-10.

WELLS, D. N. **Animal cloning: problems and prospects**. Revue Scientifique et Technique. Hamilton, New Zealand, v. 24, n. 1, p. 251-264, Apr. 2005.

ANEXOS

Revista Informe Goiano (ISSN 2525-6866)

CIRCULAR DE PESQUISA APLICADA

Publicação seriada com o objetivo de auxiliar na transferência de tecnologias, sugerir metodologias e técnicas de manejo provenientes de pesquisas das Ciências Agrárias, Biológicas, Química e Tecnologia de Alimentos, e/ou experiências validadas, ou parte destas desenvolvidas por pesquisadores/professores/extensionistas vinculados ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – IF Goiano. Lembrando que pelo menos um autor deve ser vinculado ao IF Goiano, não obrigatoriamente o primeiro autor.

Público alvo

Destina-se a produtores rurais, extensionistas, técnicos, tecnólogos, professores, estudantes e demais públicos que possam se interessar.

Conteúdo do texto

Cada número de série abordará um tema dentro da especialidade do conhecimento. A linguagem deverá ser adequada ao público alvo, sendo esta simples e objetiva, mantendo-se a impessoalidade. O texto deverá ter uma linguagem instrutiva daquilo que se quer transmitir. Exemplo: “O controle da doença deve ser feito...”; “... se faz da seguinte forma...”; evitar a utilização de verbos no passado, como, “procedeu-se”, “foi”, “foram”; evitar linguagem na forma de relatos de pesquisa.

Para publicação, o corpo deverá estar obrigatoriamente, estruturado com as seguintes sessões: Título; Autores; Importância e Relevância (Introdução); Tópicos (Desenvolvimento e Aplicabilidade); Agradecimentos (opcional) e Literatura Citada. A sessão “Tópicos” deverá estar em consonância com o título e etapas envolvidas em todo o processo, sendo estes estabelecidos pelo autor.

É indispensável a inclusão de tabelas e/ou figuras, de modo que permitam melhor compreensão da pesquisa.

Exemplo:

Circular de Pesquisa Aplicada envolvendo cultivos vegetais, os Tópicos podem ser: Aspectos gerais da cultura; Escolha de variedades; Propagação; Exigências edafoclimáticas; Épocas de

plantio; Tratos culturais; Colheita; Pós- colheita; Pragas e doenças, etc. Dentro de cada Tópico deverá haver a problematização e resolução, desenvolvimento e aplicabilidade.

Regras Gerais

Todo o trabalho deverá estar em Língua Portuguesa e seguir as orientações:

- Máximo de 10 laudas;
- Título: fonte Times New Roman, tamanho 12, negrito, centralizado e todas as letras maiúsculas;
- Autores: todos os nomes deverão ser escritos por extenso com apenas a primeira letra de cada nome em maiúsculo, fonte Time New Roman, tamanho 10 e centralizado;
- Endereço institucional e e-mail: fonte Times New Roman, tamanho 10, alinhado á esquerda;
- Título das sessões: fonte Times New Roman; tamanho 12, negrito e alinhado à esquerda, com primeira letra maiúscula;
- Texto: Times New Roman, tamanho 12, espaçamento entre linhas de 1,5 cm e justificado.

As citações deverão ser indiretas e aparecer no corpo do texto, as referências bibliográficas (em ordem alfabética) ao final. Exemplo de citações indiretas: O Informe Goiano visa ampliar a divulgação de seus resultados por meio da Circular de Pesquisa Aplicada (ALVES et al., 2015). De acordo com Alves et al. (2015) a Circular de Pesquisa Aplicada do IF Goiano, visa aumentar a visibilidade de suas pesquisas.