



CENTRO UNIVERSITÁRIO LUTERANO DE PALMAS

Recredenciado pela Portaria Ministerial nº 1.162, de 13/10/16, D.O.U. nº 198, de 14/10/2016
AELBRA EDUCAÇÃO SUPERIOR - GRADUAÇÃO E PÓS-GRADUAÇÃO S.A.

Sara Gessica Paiva

Comparativo da produção *in vitro* de embriões bovinos de doadoras vazias e prenhas no
Estado do Maranhão: RELATO DE CASO

Palmas – TO

2021

Sara Gessica Paiva

Comparativo da produção *in vitro* de embriões bovinos de doadoras vazias e prenhas no estado do Maranhão: RELATO DE CASO

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) elaborado e apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientador: Prof^ª. Dr^ª Ana Luiza Silva Guimarães

Palmas – TO

2021

Sara Gessica Paiva

Comparativo da produção *in vitro* de embriões bovinos de doadoras vazias e prenhas no estado do Maranhão: RELATO DE CASO

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) elaborado e apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientador: Prof^ª. Dr^ª Ana Luiza Silva Guimarães

Aprovado em: 08/ Julho/ 2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. . Dr^ª Ana Luiza Silva Guimarães
Orientador

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Nayara Gonçalves de Oliveira

Coordenadora do laboratório de produção *in vitro* de embriões bovinos na empresa

PECPLAN ABS IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA

Prof.^a Ma. Mariana Da Costa Gonzaga

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Palmas – TO

2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho de conclusão de curso primeiramente a Deus, por me dar força, sabedoria, fé, dedicação, paciência durante toda essa minha jornada de luta.

Aos meus pais Walter Gonçalves de Paiva e Maria das Graças de Paiva, por sempre me apoiarem, acreditarem em mim quando eu já não acreditava mais, pai e mãe vencemos, realizamos um sonho que não é apenas meu, mas nosso.

Meu irmão Jefferson Vinicius de Paiva, e sua família Ananda Sousa, Ana Luiza Paiva e Julia Paiva, que sempre me apoiou, mesmo distante, se orgulham tanto de mim, mesmo eu sendo imperfeita e cheia de defeitos.

John Kennedy Pereira Vargas uma pessoa muito especial que Deus colocou em minha vida, que me ajudou muito na realização deste sonho, serei eternamente grata por tudo que você fez por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me ajudado a concluir este trabalho, pois ele me deu força para ir a luta, que mesmo enfrentando tantos obstáculos da vida consegui vencer.

Gratidão pelas orações do meu pai Walter G. de Paiva e mãe Maria G. de Paiva. Gratidão por todas as vezes que eu ligava desesperadas para vocês falando que não iria conseguir, é vocês sempre me incentivando, e falando que iria dar tudo certo, que eu iria vencer. Pai e mãe tenho muito orgulho de vocês, vocês são minha inspiração de vida, minha base, meu tudo. Obrigada por serem minha força para continuar lutando todos os dias, por vocês que eu não desisti da vida.

Jefferson Paiva, Ananda Sousa, Ana Luiza Paiva e Julia Paiva, obrigada por toda a ajuda, por me ouvirem nos meus momentos que estava querendo desistir de tudo, obrigada por nunca me deixarem desistir, obrigada por terem tanto orgulho de mim, amo muito vocês.

Gratidão aos meus familiares da família Paiva, Costa e Vieira, que mesmo distantes sempre me apoiaram, por todo carinho, orações e torcida por mim, neste capítulo da minha vida.

Gratidão aos meus padrinhos José Gonçalves dos Santos e Isabel Oliveira de Araújo Santos por sempre me amarem com filha, cuidares de mim em tantos momentos importantes, obrigada por todas as orações, por ficarem feliz com todas as minhas conquistas, amo vocês, vocês são meu segundo país.

Agradeço de todo coração a Família Pereira e Vargas por todo carinho, cuidado, momentos de alegria, risada, nossos dias de domingo em família, por fazer com que eu sinta o aconchego de ter um lar aqui em Palmas, vocês sempre estarão em meu coração.

Em especial ao John Kennedy Pereira Vargas por sempre me incentivar, me apoiar, e esteve ao meu lado durante estes mais de 4 anos. Por vibrar com as minhas conquistas e estar comigo nos momentos mais difíceis e mais felizes, nas loucuras e brincadeiras mais bobas, obrigada por todo cuidado comigo quando tive minhas crises, gratidão por tudo menino véi. Você sempre terá o seu lugar em meu coração, obrigada por fazer parte deste meu capítulo tão lindo, da realização de um sonho que se encerra para dar início a outros

Aos meus professores muito obrigada por compartilharem o conhecimento de vocês, por todo ensinamento não só profissional mas pessoal também, obrigada por todo carinho, cuidado, broncas, vocês são muitos mais que amigos, são minha família que fiz aqui em Palmas. Em especial a minha orientadora, professora Ana Luiza Guimarães, por toda

paciência, dedicação, apoio nesta fase que estou lutando, obrigada por sempre me acolher como filha, por todo cuidado que sempre teve comigo.

Por falar em família não posso esquecer de agradecer aos amigos que faculdade me deu, que sempre me apoiaram, foram meu companheiros em momentos difíceis, alegres, tristes também, obrigada por todo carinho, e vocês sempre ficarão guardados em meu coração, obrigada Vagner Tavares, Aristeu Neto, Arthur Delmondes, Barbara Rocha, Juliana Lima, Mikaella Correia, Hugo Feitosaa, Failky Ferreira, Matheus Silva, João Inácio, Luciene Demarchi, Fabiana Steinmetz, Manoel, Marcelo Rocha, Pedro Erick, Karoline Arantes, PC (Paulo Cesar Zanatta), Roberta Abreu, Itamar Toledo, Andreza Aires, Lays Paia. Em especial a Beatriz Galavotti que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis, você é bem mais que amiga e irmã de outra mãe.

Obrigada Mayara Valadares por ter me incentivado a vir para essa cidade tão especial, você é aquela amiga que não conversamos todos os dias, mas sabemos que sempre uma estará ali para ajudar a outra, gratidão por tudo.

Gratidão por todo conhecimento compartilhado, acolhimento, ajuda na realização do TCC, as brincadeiras durante as viagens, os dias de frozen. Obrigada meninas da ABS, Dona Josy (Juzieth Nunes), Camila Vilanova, Nayara Oliveira, Mikaelle Quintino, Thaisa Cassiano, Patricia Martins, Edilene Silva. É aos meninos da TE e OPU Ricardo Leal, Guilherme Teixeira, Rodrigo Untura, Layson Souza e Paulo Aguiar. Finalizei meu estágio com o gostinho de sonho realizado, pois muitas vezes ouvi que meu sonho em trabalhar com reprodução bovina era loucura, mas como diz o Ricardo Leal “a vida do country não é fácil”, fui a luta e consegui.

Obrigada a todos que fez e faz parte da minha história de vida, sou grata a Deus por ter conhecido cada um de vocês, grata pela ajuda de todos na realização deste sonho.

“Não me pergunta se minha família foi perfeita. Não foi e não é, mas acho que posso dizer que tenho uma família que faz força para ser honesta e boa.”

Maria das Graças de Paiva

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 - Classificação de embriões produzidos <i>in vivo</i> , conformes seu estágio de desenvolvimento	25
Figura 2 - Oócitos bovinos 24H após MIV. Na imagem observa-se a expansão das células do <i>cumulus</i> .	26
Figura 3 - Pellet obtido após centrifugação em gradiente Percoll 45/90.	27
Figura 4 - Sêmen depositado na gota contendo os oócitos maturados, para que ocorra a fecundação.	28
Figura 5 - Zigotos antes do processo da lavagem no Cultivo <i>in vitro</i> .	29
Figura 6 - Zigotos em estágio em divisão célula.	29
Figura 7 - Imagem A e B; Classificação dos embriões em MO, BI, BL e BX.	30
Figura 8 - Laboratório montado, no qual foi realizado o envase dos embriões.	30
Figura 9 - Embriões envasados, dentro da transportadora.	31

QUADROS

Quadro 1 - Quantidade de oócitos aspirados conforme sua classificação em Grau I, II, III, descarte, citoplasma irregular (CIT), total de oócitos viáveis e total de oócitos aspirados.	31
Quadro 2 - Quantitativo de zigotos cultivados e clivados. Previsão de embriões produzidos.	32
Quadro 3 - Classificação dos embriões produzidos, sendo eles classificados em Mórula (MO), Blastocisto Inicial (BI), Blastocisto (BL) e Blastocisto Expandido (BX).	33
Quadro 4 - Quantidade de oócitos qualidade aspirados e total de produção de embriões obtidos a partir destes oócitos.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE	Blastocisto Eclodido
BI	Blastocisto Inicial
BL	Blastocisto
BX	Blastocisto Expandido
CEULP/ULBRA	Centro Universitário luterano de Palmas
CFA	Contagem de folículos atraís
CIV	Meio de cultivo <i>in vitro</i>
CIT	Citoplasma irregular
CL	Corpo lúteo
CCOs	Complexo <i>Cumulus</i> Oócitos
Dr ^a	Doutora
ECC	Escore de Condição Corporal
EMRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
IA	Inseminação Artificial
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MO	<i>Mórula</i>
OPU	<i>Ovum pick up</i>
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
Prof. ^a	Professora
SOV	Superovulação
SOF	<i>Synthetic Oviductal Fluid</i>
TCC	Trabalho de conclusão de curso

TE Transferência embrionária

TO Tocantins

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
H	Horas
ml	Mililitros
μl	Microlitros
N ₂	Nitrogênio
O ₂	Oxigênio
pH	Potencial Hidrogeniônico

RESUMO

O presente trabalho objetiva trazer um relato de caso de um comparativo da produção *in vitro* de embriões bovinos de doadoras vazias e prenhas da raça Nelore de uma propriedade em acompanhamento durante o estágio.

Entende-se que a reprodução *in vitro* busca garantir o melhoramento genético das raças, garantindo maior reprodutividade e qualidade. Nesse sentido, o estudo de caso comparativo busca apontar qual a doadora apresenta melhor resultado na produção *in vitro* de embriões.

Desenvolveu-se um estudo teórico, para complementar o estudo de caso e fornecer evidências científicas que suportam o desenvolvimento desta pesquisa. O qual obteve-se que as doadoras vazias produziram mais oócitos viáveis no total, entretanto as doadoras prenhas produziram mais oócitos de melhor classificação. As doadoras prenhas obtiveram melhores resultados quanto a clivagem dos zigotos, desenvolvimento embrionário (previsão) e embriões produzidos, do que as doadoras vazias. Demonstrando que as doadoras prenhas obtêm melhor resultado qualitativo e as doadoras vazias quantitativo.

Palavras-chave: Reprodução, Biotécnicas reprodutivas, Oócitos.

ABSTRACT

The present work aims to bring a case report of a comparison of the in vitro production of bovine embryos from empty and pregnant Nellore donors from a farm being monitored during the internship.

It is understood that in vitro reproduction seeks to ensure the genetic improvement of breeds, ensuring greater reproducibility and quality. In this sense, the comparative case study seeks to point out which donor has the best result in in vitro embryo production.

A theoretical study was developed to complement the case study and provide scientific evidence to support the development of this research. It was found that the empty donors produced more viable oocytes in total, however the pregnant donors produced more oocytes of better classification. Pregnant donors had better results regarding zygote cleavage, embryonic development (prediction) and produced embryos than empty donors. Demonstrating that pregnant donors obtain better qualitative results and empty donors quantitatively.

Keywords: Reproduction, Reproductive Biotechniques, Oocytes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. DESENVOLVIMENTO	18
3.1 BIOTÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ANIMAL NO BRASIL	18
3.2 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	20
3.3 ETAPAS DA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	21
3.3.1 OBTENÇÃO DE OÓCITOS	21
3.3.2 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS	22
3.3.3 FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS	23
3.3.4 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DOS EMBRIÕES	24
4 MATERIAL E MÉTODO	26
4.1 DO LOCAL, DOS ANIMAIS E DA OBTENÇÃO DE OÓCITOS	26
4.2 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> (MIV)	26
4.3 SELEÇÃO ESPERMÁTICA E FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV)	27
4.4 CULTIVO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO <i>IN VITRO</i> (CIV)	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

No cenário nacional, a atividade agropecuária sempre foi elemento central no desenvolvimento socioeconômico brasileiro. Nas últimas décadas, a pecuária bovina foi se caracterizando como a fronteira da expansão agrícola, incorporando novas terras, novas infraestrutura e novas técnicas de reprodução, garantindo um aumento nas taxas dos rebanhos para abate e, conseqüentemente, na disponibilidade de alimento no país (CARVALHO; ZEN, 2017).

Em 2019, o Brasil registrou a marca de 214,7 milhões de bovinos nacionais, apresentando um aumento de 0,4% frente aos anos anteriores, onde vinha apresentando baixa na produção nacional (SALATI, 2020). Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021) apontam para uma retração de 10,3% no abate de bovinos, quando comparado ao 4º trimestre de 2020, apontando uma redução, inclusive, no consumo de carne e na compra de couro. Conforme destaca a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2021), nas últimas quatro décadas, a produção bovina no Brasil sofreu grandes transformações – científicas e tecnológicas – que ampliaram a produtividade, as taxas de natalidade, a genética e o manejo animal. Dentre os destaques, as biotécnicas de reprodução foram essenciais para esse processo, especialmente por causa da mudança genética, que possibilitou a melhor seleção destes animais (EMBRAPA, 2021).

Como Castro, Fernandes e Leal (2018) destacam, a bovinocultura de corte apresenta quatro pilares específicos para seu desenvolvimento: a nutrição, a sanidade, o melhoramento genético e a reprodução, destacando este último como um dos grandes responsáveis na determinação da eficiência da produção animal, referindo-se ao número de crias que podem ser geradas no período de vida da fêmea. Para os autores, o adequado manejo animal e uma alta eficiência reprodutiva do rebanho são elementos essenciais para uma melhora nos processos reprodutivos a longo prazo, evocando melhorias tecnológicas e biológicas que podem ser empregadas nesse processo.

Nesse processo, o destaque dado a um planejamento produtivo de uma propriedade se destaca como fundamental importância para aumentar a eficiência reprodutiva de bovinos, impactando diretamente sobre produtividade e saúde financeira dos empreendimentos (CASTRO; FERNANDES; LEAL, 2018). Diante disso, inúmeras estratégias de manejo, amplamente utilizadas no processo reprodutivo. Nesse processo, ganha destaque a escolha da matriz de reprodução com impacto direto sobre o processo (CASTRO; FERNANDES; LEAL, 2018). A partir da expansão do mercado, inúmeras biotecnologias foram se desenvolvendo e

aprimorando, especialmente com relação aos bovinos. A princípio, o uso de inseminação artificial (IA) apresentou um papel significativo na disseminação e material genético do macho para que, posteriormente, desenvolveram-se técnicas de controle de ciclo estral, superovulação (SOV) e a transferência de embriões (TE), que possibilitaram um aumento da multiplicação do material genético (LUEDKE et al., 2019).

Conforme destaca Vieira (2012), a biotecnologia na produção *in vitro* de embriões teve início em 1953, dando início às investigações sobre reprodução e melhoramento genético. No Brasil, o avanço do melhoramento genético ganhou força na década de 1980, levando a transformações significativas na indústria da fertilização bovina *in vitro*, gerando impacto na produção e tecnologias em programas de melhoramento de rebanhos de produção e leite (VIEIRA, 2012). O refinamento das técnicas se estabeleceu em fatores intrínsecos e extrínsecos que buscaram melhorar biotécnicas de reprodução animal no Brasil, e melhoramento genético dos rebanhos (BELTRAME et al., 2010).

Para Castro, Fernandes e Leal (2018), frente à importância da reprodução sobre a cadeia produtiva bovina, verifica-se que a seleção dos machos e fêmeas e a caracterização das matrizes para reprodução se estabelecem como extremamente essenciais para a melhoria na reprodução e produção. A qualidade oocitária, eficiência na reprodução, e menores taxas de clivagem dão destaque à reprodução *in vitro*, justificando-se pela qualidade e quantidade de embriões produzidos. Grande parte da possibilidade de obtenção de oócitos de animais vivos por meio de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU), permite um intenso aproveitamento do material genético de fêmeas superiores (CASTRO; FERNANDES; LEAL, 2018).

Exposto isso, e considerando a evolução do processo de reprodução em bovinos, este estudo tem como objetivo trazer um relato de caso de um comparativo da produção *in vitro* dos embriões de doadoras vazias e prenhas da raça Nelore da propriedade localizada em Buriticupu – MA, durante o acompanhamento das rotinas do estágio curricular. Este trabalho se justifica devido à sua contribuição teórica na compreensão da qualidade produtiva de embriões com melhor desenvolvimento genético por meio de um comparativo. Na prática, este estudo contribui para a compreensão do processo reprodutivo visando melhoramento genético. Com relação às contribuições teóricas, fomenta estudos ligados ao melhoramento genético por meio de aplicabilidade prática.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho objetiva trazer um relato de caso de um comparativo da produção dos embriões *in vitro* de oócitos oriundos de doadoras vazias e prenhas da raça Nelore de uma propriedade e em um acompanhamento durante o estágio curricular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dentre os objetivos específicos definidos para esta pesquisa, estão

- a) Uma construção teórico-metodológica da produção de embriões *in vitro*;
- b) Estudo de campo desenvolvido com vacas de uma propriedade localizada no município de Buriticupu-MA.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 BIOTÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ANIMAL NO BRASIL

Biotécnicas de reprodução animal são ferramentas bastante singulares ao avanço tecnológico da pecuária brasileira, permitindo a expansão da seleção de material genético que se adequa ao melhoramento animal e se demonstraram indispensáveis à pecuária nacional (LUEDKE et al., 2019). Existem avanços biológicos e tecnológicos que são desencadeados pela necessidade de melhoria nos processos reprodutivos, garantiram que as últimas quatro gerações tecnológicas proporcionassem desenvolvimento à reprodução assistida, fosse para humanos ou para animais (LUEDKE et al., 2019).

Castro, Fernandes e Leal (2018) destacam o potencial brasileiro para reprodução de bovinos, que, no entanto, seguem apresentando uma baixa eficiência reprodutiva e produtiva, com índices insatisfatórios na reprodução do corte bovino, tais como “taxas de prenhez, parição, natalidade, desmama e produtividade de quilos de bezerros desmamados/vaca relativamente baixo” (CASTRO; FERNANDES; LEAL, 2018, p. 43). Estratégias de manejo que ganham destaque no processo reprodutivo de bovinos, especialmente no que concerne à garantia de qualidade e eficiência reprodutiva, são destacadas por Castro, Fernandes e Leal (2018), como:

- escolha de matrizes e touros para a reprodução;
- estabelecimento de uma estação de monta e de parição;
- escolha de um sistema de acasalamento;
- adoção de protocolos de sincronização de estro;
- diagnóstico de gestação precoce e descarte de fêmeas inférteis;
- monitoramento do Escore de Condição Corporal (ECC) das fêmeas e atendimento de suas exigências nutricionais;
- preparo de novilhas para reposição, controle sanitário do rebanho; e
- determinação da idade ao desmame (CASTRO; FERNANDES; LEAL, 2018, p. 43).

A primeira geração de tecnologia de reprodução incluiu técnicas de IA, criopreservação de gametas e embriões. Em seguida, observaram-se técnicas de SOV e TE. A terceira geração, por outro lado, apresentou técnicas de sexagem espermática e embrionárias, recuperação de oócitos e fertilização *in vitro*. Por fim, a quarta geração envolveu clonagem por transferência nuclear de células embrionárias e/ou semióticas, transgenia e biologia de células-tronco. Nesse processo evolutivo de técnicas, elas se encaixam sob uma interligação bastante ampla entre si (BERTOLINI; BERTOLINI, 2009).

Duarte (2019) e Luedke et al. (2019) classificam a biotecnologia reprodutiva como uma aplicação tecnológica que pode ser usada para modificar a reprodução animal por meio

de intervenção humana a fim de criar técnicas mais precisas. A adoção destas técnicas contribuiu significativamente para o melhoramento genético da produção bovina, garantindo um manejo reprodutivo nas propriedades que refletem sobre o ciclo reprodutivo reduzindo problemas de infertilidade no processo. O uso de biotécnicas reprodutivas apresentam vantagens que vão além da redução da infertilidade, servindo como ferramentas de reconhecimento da fisiologia feminina e masculina inclusive (DUARTE, 2019; LUEDKE et al., 2019).

Conforme Duarte (2019), os benefícios perpassam por algumas questões específicas, mas também apresentam algumas desvantagens. Dentre as desvantagens destacadas pelo autor, é a possibilidade que estas biotécnicas possam causar alguma perda na variabilidade quando elas são utilizadas equivocadamente. Dentre as vantagens, verifica-se o auxílio a reprodução de animais que são geneticamente superiores, a contribuição à formação de bancos de germoplasma animal e a reposição de animais sob ameaça de extinção.

Destaca-se, a seguir, técnicas de reprodução animal que preconizaram mudanças nesse espaço, tais como a reprodução por inseminação artificial. Uma das biotecnologias reprodutivas mais antigas e mais empregadas na reprodução animal foi a inseminação artificial (IA), caracterizada pelo coito entre fêmea e macho com interferência humana. O termo IA foi definido devido à deposição de espermatozoides no trato reprodutivo feminino por meio de recursos artificiais (KALANTARI; CABRERA, 2015). A IA tem sido implementada como forma de estabelecer um melhoramento genético. Tem sido utilizada, inclusive, para o aumento da produtividade com relação à carne no Brasil e no mundo, por exemplo (DUARTE, 2019).

O manejo reprodutivo passou a apresentar um melhor desempenho a partir do emprego de técnicas mais sofisticadas como a IA, os procedimentos reprodutivos ganharam cada vez mais destaque no espaço acadêmico, levando a pesquisas que buscavam preconizar mudanças pioneiras nesse sentido (KALANTARI; CABRERA, 2015). Conforme explica Duarte (2019), a compreensão da evolução científica permitiu que técnicas mais específicas, que evitassem a perda de eficiência reprodutivas, fossem desenvolvidas.

Luedke et al. (2019) destaca, por outro lado, a obtenção de oócitos, que podem ser obtidos por meio da coleta em doadoras vivas a partir da aspiração folicular ou por meio da punção de ovários de fêmeas abatidas em abatedouros. Como os autores destacam, por algum tempo a punção *in vivo* era realizada por meio de laparotomia, o que dificultava o procedimento devido às complicações pós-cirúrgicas, ao tempo e ao custo relacionados à prática. Tais processos foram precursores da produção de embriões *in vitro*, reprodução que

surgiu para fins de reprodução comercial na década de 1990, proposta de inovação tecnológica que foi pioneiramente desenvolvida pelas empresas Beabisa Agricultura LTDA e Gertec Tecnologia de Embriões, conforme explicam Souza e Abade (2018).

3.2 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

A produção *in vitro* de animais bovinos advém de uma longa cultura de melhoramento genético na criação de animais geneticamente superiores, onde se privilegia a fêmea com alto valor genético. Conforme destacam Souza e Abade (2018, p. 96), a técnica de produção *in vitro* permite que sejam desenvolvidos animais com uma genética superior do plantel, maximizando a reprodução e acelerando o processo genético que permite reduzir o intervalo entre as gerações dos animais. Gonçalves e Viana (2019) destacam que a produção mundial ampliou 197,8% no período de 1997 a 2007, indicando, além de uma evolução numérica, mudanças científicas e tecnológicas no país para com relação à temática.

Nesse sentido, a produção *in vitro* de animais bovinos mimetiza o que fisiologicamente ocorre *in vivo*, ou seja, permite que se tenha contato com o ócito da fêmea fora do trato reprodutivo com o espermatozóide, levando a formação do indivíduo sob condições de controle que são pré-estabelecidas. A produção *in vitro* de embriões (PIVE) consiste na separação e co-cultivo de gametas em um ambiente laboral que permita a geração do zigoto, cultivando-o até seu estágio embrionário desejado. A técnica se relaciona a uma variedade 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” (LUEDKE et al., 2019, p. 122).

Conforme Penitente Filho, Oliveira e Torres (2012) destacam que a PIVE funciona como uma técnica de seleção de embriões, buscando aprimorar condições de cultivo *in vitro*, especialmente voltado à escala comercial. Conforme destacam os autores, cada fêmea bovina pode ser capaz de produzir entre 50 a 100 embriões/ano. Levando isso em consideração, são estabelecidas, em média, duas punções semanais por doadoras ao longo de vários meses.

A utilização de PIVE, conforme os autores destacam, é aplicada porque permite o melhoramento genético animal, elemento bastante requerido dentre aqueles que buscam a reprodução animal, aumenta a intensidade e a pressão da seleção, o que garante resultados melhores no final do processo, e reduz o intervalo entre a geração de uma parição e outra (BARUSELLI et al., 2019). Conforme destaca Baruselli et al. (2019), o uso do PIVE tem contribuído cada vez mais para o aumento da qualidade e da quantidade do produto final.

3.3 ETAPAS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Conforme destacam Souza e Abade (2018), uma das primeiras etapas do processo de produção *in vitro* em embriões bovinos depende da obtenção de oócitos. A partir disso, desenvolve-se a maturação *in vitro*, a fertilização e o cultivo até que o estágio de mórula e blastocisto seja alcançado, geralmente no sétimo dia após a fecundação do óvulo. É neste momento que os embriões se encontram prontos para serem transferidos ou criopreservados. Estas etapas são interligadas e realizadas dentro de uma infraestrutura adequada em laboratório para a reprodução animal (SOUZA; ABADE, 2018).

3.3.1 OBTENÇÃO DE OÓCITOS

De acordo com a pesquisa de Serafim (2017), existem diversas técnicas que permitem a coleta dos óvulos para PIVE. Souza e Abade (2018) destacam que um dos primeiros procedimentos realizados se davam por meio de laparotomia ventral média, logo após a superovulação *in vivo* ou por meio da coleta *post mortem* de ovários a partir da punção folicular, *slicing* e/ou curetagem da parede folicular. Avanços consideráveis nesse processo acabaram por facilitar os métodos de obtenção de oócitos em animais *in vivo*, que ficou popularmente conhecida como aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia – *Ovum pick up* (OPU), favorecendo, inclusive, programas de melhoramento genético.

Conforme destaca Alves et al. (2001), o OPU foi elaborado como uma demanda por procedimentos de coleta do complexo cumulus-oócito que fosse menos traumática que uma abordagem cirúrgica. A proposta apresenta inúmeros benefícios, como elencam Souza e Abade (2018) e Duarte (2019), tais como ser pouco invasiva, poder ser utilizada em qualquer fase do ciclo estral, permitindo que se obtenha óvulos de fêmeas a partir de 6 meses de idade, fêmeas idosas, de animais pré-púberes ou de animais que apresentam gestação inicial até o terceiro mês, permitindo, ainda, que a coleta seja realizada na segunda e terceira semanas após o parto do animal.

Para além destas questões, os autores ainda enfatizam que outro benefício observado nesse processo de coleta de óvulos está na não interferência no estado fisiológico do animal, visto que não exige nenhum tipo de estimulação hormonal exógena, onde as sessões de aspirações foliculares possam ser realizadas de 15 em 15 dias ou de modo mensal. A periodicidade da coleta garante, aproximadamente, 40% de índices de reprodução com relação

aos rendimentos, permitindo que se observe uma superação nos índices de reprodução obtidos por meio de transferência de embriões, tornando a técnica não apenas rentável, mas efetiva, estabelecendo uma linha clara entre custo e benefício.

Conforme Souza e Abade (2018, p. 98), “a técnica de OPU possibilita a coleta em animais de alto valor genético que por algum motivo possuem infertilidade, tornando-se possível a obtenção de oócitos gerando produtos descendentes”. Essa coleta de oócitos nas fêmeas bovinas acaba sendo realizada por meio de punção a partir de uma agulha acoplada a uma sonda transvaginal, permitindo que os folículos puncionados sejam observados por meio de ultrassom. Os oócitos são, assim, aspirados e devem possuir o diâmetro de 2 a 8 mm. Folículos menores que o mínimo de 2 mm são incapazes de recomeçar a fase de meiose e os maiores de 8 mm se encontram em estágio de atresia para a maturação, tornando essas duas formas inviáveis.

Durante esse procedimento, conforme destaca Duarte (2019), existe um sistema de bomba à vácuo que é acoplado à agulha, que libera a recuperação de oócitos e do líquido folicular para dentro do tubo coletor. A partir disso, realiza-se uma seleção destes que se baseia nas características das células do cumulus e no aspecto do citoplasma do oócito, classificados, diante disso, conforme a morfologia das camadas: Grau I (ótimo), Grau II (bom), Grau III (regular) e citoplasma irregular e degenerado em função da morfologia e da qualidade que apresentam. Após estes procedimentos, Souza e Abade (2018) destacam que os oócitos selecionados devem ser transportados até o laboratório para que se inicie a etapa de manutenção.

3.3.2 MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS

Conforme Hardy et al. (2000) e Fissore et al. (2002) verificaram, que foram corroborados por Souza e Abade (2018) e Duarte (2019), que o desenvolvimento da maturação dos oócitos se distribui em uma série bastante complexa de eventos nucleares e citoplasmáticos. O processo de maturação, a partir da retirada do ambiente folicular, se classifica como um processo simples na espécie bovina, podendo ser verificado por meio de maturação *in vitro* de oócitos que o “fator inibitório da maturação desaparecia, permitindo o desenvolvimento dos oócitos fora do ambiente folicular (SOUZA; ABADE, 2018, p. 99). Esses oócitos estão em um estado adormecido além de serem pequenos e imaturos. À medida que se observa as ondas foliculares com intervalos regulares, verifica-se que é este o momento

em que os oócitos crescem e maturam. Apenas um oócito será ovulado, o dominante, enquanto o restante sofrerá atresia.

Existe, como Chian et al. (2004) destaca, uma diferença entre embriões *in vivo* e *in vitro*, já que oócitos maturados *in vitro* não possuem o mesmo potencial do que aqueles maturados *in vivo*. Conforme destacam Souza e Abade (2018) protocolos diferentes sobre o cultivo *in vitro* foram testados para a maturação dos oócitos, e atualmente, o meio mais como em laboratório é o TCM 199, geralmente suplementado com substâncias de soro fetal bovino ou mesmo gonadotrofinas, como FSH, LH e estradiol 17 β . Os autores destacam ainda o uso de aminoácidos como a L-glutamina, o bicarbonato de sódio, o piruvato de sódio, lactato, vitaminas e antibióticos que estão sob condições controladas de temperatura e atmosfera.

Conforme destacam Souza e Abade (2018, p. 100), tal processo permite e acaba envolvendo “uma série de transformações nucleares, citoplasmáticas e moleculares que tornam o gameta feminino apto a ser fecundado”, fazendo-se assim importante que os meios utilizados durante este período mimetizam condições que são encontradas durante o processo de maturação.

Após a maturação, o desenvolvimento dos oócitos pode ser afetado por inúmeros fatores, como temperatura, pH, osmolaridade, tensão de CO₂ e O₂ e mesmo o uso de soro e células somáticas. Após o tempo de intubação, os oócitos completam a maturação e estão prontos para o processo de fecundação (AVELINO et al., 2002).

3.3.3 FECUNDAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS

Para Souza e Abade (2018), a fecundação *in vitro* é a etapa na qual os oócitos, já maduros, são cultivados junto com os espermatozoides, e então fecundados, levando a geração de um zigoto que evoluirá ao estágio de blastocisto. A fecundação é realizada dentro de um período de 22 a 24 horas, sob uma temperatura de 38,5 °C, com uma atmosfera com 5% de CO₂ em ar e com umidade de 95%. Durante a fase de fecundação, tem-se a combinação do material genético dos gametas para a formação do zigoto.

Conforme Melo et al. (2016), o meio mais adequado à fecundação é o Fert-TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato), que possui agentes capazes de promover a capacitação espermática, tal como a heparina. Para isso, faz-se uso de espermatozoides de palhetas de sêmen congelado, “sendo convencional ou sexado” (SOUZA; ABADE, 2018, p. 101), onde a recuperação destes se dá por meio do gradiente Percoll para a obtenção de uma fração espermática viva após o descongelamento do sêmen. O Percoll é geralmente composto por

partículas de sílica coloidal recoberta por polivinilpirrolidona, que é preparado em diferentes concentrações com o objetivo de formar um gradiente para a separação do esperma (SERAFIM, 2017[ALG1]).

Para Souza e Abade (2018), outras técnicas podem ser empregadas nesse processo, como o “swim-up”, método que se baseia na mobilidade do espermatozóide migrar do sedimentado para a centrifugação no meio de cultura. Os autores destacam que a concentração utilizada deve ser de 2×10^6 espermatozoides / ml, calculada com base na motilidade e na concentração da fração viva do espermatozóide que é obtido após a centrifugação em Percoll.

3.3.4 CULTIVO *IN VITRO* DOS EMBRIÕES

O cultivo compreende o desenvolvimento do zigoto até o estágio de blastocisto, que apresenta fases extremamente importantes como a clivagem, a ativação do genoma embrionário, a compactação dos blastômeros, a diferenciação da distinção embrionária e a formação e a expansão do blastocele, assim como o rompimento da zona pelúcida, conforme explicam Serafim (2017) e Duarte (2019). Souza e Abade (2018) destacam que as características de um embrião *in vitro* são inferiores quando comparados de um embrião *in vivo*, uma vez que o embrião *in vitro*, apresenta um citoplasma com coloração mais escura e com uma densidade menor, por causa do conteúdo lipídico.

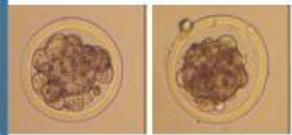
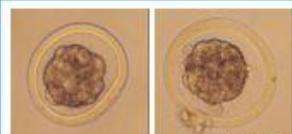
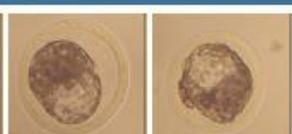
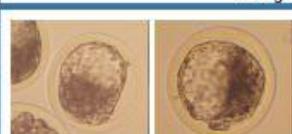
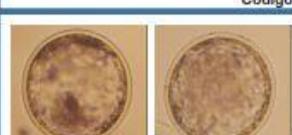
Para que a fecundação *in vitro* obtenha sucesso, faz-se primordialmente necessário que as “composições dos meios artificialmente sejam similares ao ambiente e aos fluidos do útero e do oviduto de uma vaca durante o início de uma gestação” (SOUZA; ABADE, 2018, p. 101). O suporte à nutrição celular tem papel fundamental nesse processo, devendo-se priorizar nutrientes, pH, hormônios e o oxigênio em quantidades aproximadas ao ambiente uterino (SERAFIM, 2017). Após as 18-22 horas de fecundação, desnudam-se os possíveis zigotos com uma pipeta e eles são transferidos para o meio de cultivo *in vitro* (CIV), onde geralmente se utiliza o meio Synthetic Oviductal Fluid (SOF), desenvolvido a partir de um fluido do oviduto das fêmeas bovinas, expressando taxas positivas e significativas sem que se observem células somáticas. Conforme Corrêa (2006), Palma (2008), Melo et al. (2016), Serafim (2017) Souza e Abade (2018), Duarte (2019) e outros, o CIV exige um ambiente adequado, onde o tempo de variação de todo o processo de desenvolvimento deva levar de 7 a 9 dias, dependendo da forma, técnica e dos meios empregados pelo laboratório.

O desenvolvimento embrionário é avaliado para verificar a possibilidade de transferência dos embriões a fresco ou para congelamento. Nesse processo, a classificação

morfológica se torna uma ferramenta indispensável à seleção dos embriões. Existem diferentes classificações da qualidade dos embriões, às quais podem ser observadas abaixo segundo a EMBRAPA 2009:

- Mórula (MO): os blastômeros ainda são evidentes, dando início ao processo de compactação;
- Blastocisto Inicial (BI): neste momento inicia a formação do blastocele, que fará com que comece a diferenciação entre o trofoblasto e a massa célula interna;
- Blastocisto (BL): terá o aumento de tamanho do blastocele, que será maior que a massa célula interna, e o trofoblasto sofrerá diferenciação em sua morfologia e funcionalidade;
- Blastocisto Expandido (BX): o embrião irá aumentar o seu tamanho e com isso fará com que a espessura da zona pelúcida diminua, também estará mais desenvolvido o trofoblasto e a massa célula interna poderá ser observada;
- Blastocisto Eclodido (BE): é quando ocorre o rompimento da zona pelúcida e o embrião começa a sair da zona pelúcida para ter contato com o tecido materno.

Figura 1 - Classificação de embriões produzidos in vivo, conformes seu estágio de desenvolvimento.

		<p>Mórula Fase esperada: dias 5,5-6,0 do ciclo Características: Blastômeros ainda evidentes, porém não é mais possível determinar número exato. Massa de células ocupa maior parte do espaço dentro da zona pelúcida. Período caracterizado pelo fim da fase de celularização e da transição materno zigótica e início do processo de compactação.</p>
<p>8 - 12 Células Código IETS: 2</p>	<p>Mórula Código IETS: 3</p>	
		<p>Mórula Compacta Fase esperada: dias 6,0 a 6,5 do ciclo Características: Compactação torna a massa de células coesa, dificultando individualização dos blastômeros, e causa retração do embrião em relação à zona pelúcida, com aumento do espaço perivitelínico. Formação de junções de adesão e de oclusão entre as células, preparando o embrião para a formação da blastocela.</p>
<p>Mórula Compacta Código IETS: 4</p>	<p>Mórula Compacta Código IETS: 4</p>	
		<p>Blastocisto Inicial Fase esperada: dias 6,5 a 7,0 do ciclo Características: Blastômeros criam gradiente osmótico que atrai água para o espaço intercelular, iniciando a formação de uma cavidade denominada blastocela. Perda da totipotência, com a formação de duas populações celulares distintas: o trofoblasto, que reveste a blastocela, e a massa celular interna (MCI), lateral à blastocela.</p>
<p>Blastocisto Inicial Código IETS: 5</p>	<p>Blastocisto Inicial Código IETS: 5</p>	
		<p>Blastocisto Fase esperada: dias 7,0 a 7,5 do ciclo Características: Blastocela aumenta de tamanho, tornando-se proporcionalmente maior que a massa celular interna e ocupando gradualmente todo o espaço perivitelínico. Trofoblasto sofre diferenciações morfológicas e funcionais associadas à captação de nutrientes, enquanto as células da MCI mantêm potencialidade.</p>
<p>Blastocisto Código IETS: 6</p>	<p>Blastocisto Código IETS: 6</p>	
		<p>Blastocisto Expandido Fase esperada: dias 7,5 a 8,0 do ciclo Características: Expansão da blastocela causa aumento de tamanho do embrião e progressiva redução na espessura da zona pelúcida (ZP). Maior desenvolvimento do trofoblasto, a MCI é visível dependendo da posição do embrião. Rompimento da ZP caracteriza a eclosão, com o embrião entrando em contato direto com os tecidos maternos.</p>
<p>Blastocisto Expandido Código IETS:</p>	<p>Blastocisto Eclodido Código IETS: 8</p>	

Fonte: EMBRAPA 2009

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 DO LOCAL, DOS ANIMAIS E DA OBTENÇÃO DE OÓCITOS

Para o relato do caso deste presente trabalho, foi acompanhado a aspiração de doadoras bovinas para PIVE, em propriedade localizada no município de Buriticupu- MA, pertencente a cliente assistido pela empresa ABS Pecplan, durante o final da estação de monta do ano de 2021.

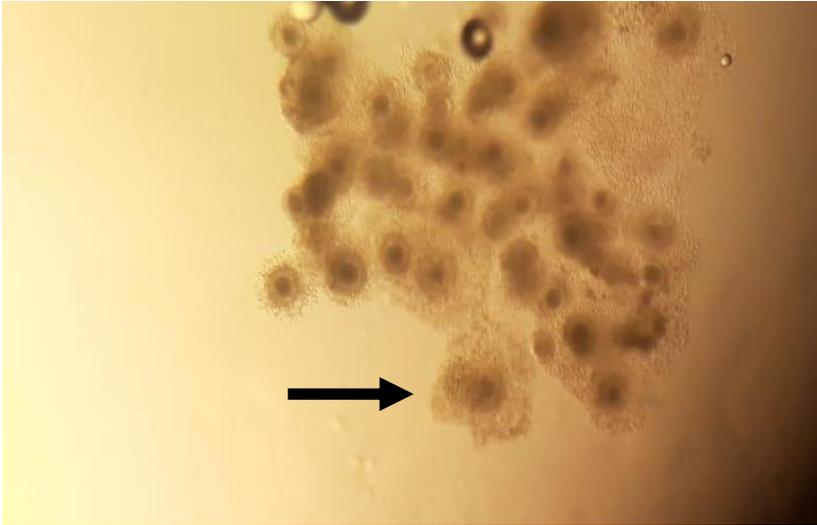
As doadoras foram categorizadas como vacas e novilhas super precoces, com idades de 5 a 10 anos e 14 a 18 meses respectivamente, entre elas 17 animais prenhes e 33 vazias. Os animais foram mantidos em pasto, suplementada com sal mineral próprio para reprodução, com 80% de fósforo, e água *ad libitum*. Elas também foram suplementadas com o kit adaptador para melhorar a qualidade dos oócitos.

Foram realizados dois dias de OPU *Ovum pick up* (aspiração folicular) sendo eles dia 16/03/2021 e 17/03/2021, utilizando uma guia de aspiração acoplada a um transdutor convexo de 7,5 MHz. Os CCOs recuperados foram selecionados sob um microscópio estereoscópico, classificando os oócitos em grau 1, 2 e 3. Foram aspirados 1.830 oócitos, destes 1.410 apresentando-se viáveis. Posteriormente, os CCOs foram colocados em microtubos contendo meio de maturação e óleo mineral transportado em uma transportadora de oócitos a uma temperatura de 37° C até o laboratório, localizado na cidade de Xinguara-PA.

4.2 MATURAÇÃO IN VITRO (MIV)

CCOs selecionados foram lavados e transferidos em grupos de para gotas de meio de maturação cobertas por óleo mineral, para auxiliar na não ocorrência de evaporação do meio de maturação e facilitar a absorção rápida dos hormônios esteróides que são adicionados ao meio. Assim, o período necessário à maturação foi geralmente estabelecido entre 18 e 24 horas em uma atmosfera controlada, contendo 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ em ar, com umidade saturada, a uma temperatura de 38,5° C (Figura 1). O meio de maturação consistiu de TCM -199 suplementado com fonte proteica, hormônios e antibiótico.

Figura 2 - Oócitos bovinos 24H após MIV. Na imagem observa-se a expansão das células do *cumulus* (seta preta).



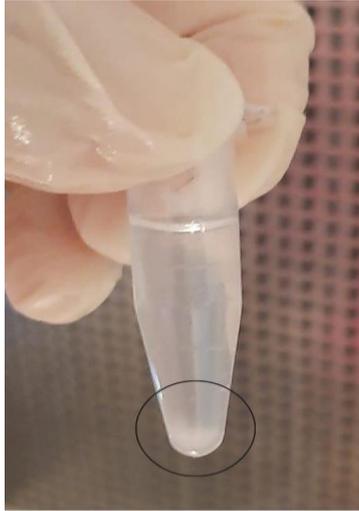
Fonte: Arquivo pessoal, 2021

4.3 SELEÇÃO ESPERMÁTICA E FECUNDAÇÃO IN VITRO (FIV)

Após a maturação, CCOs foram transferidos para gota de meio de fecundação. Foi utilizado no processo da FIV, sêmen de 12 touros da raça Nelore, convencional, com fertilidade conhecida, utilizou-se no processo de FIV todos os oócitos aspirados. Espermatozoides móveis foram obtidos pelo método de Percoll 45/90 (Machado et al., 2009) para obtenção do pellet (Figura 2) e foram adicionados às gotas contendo CCOs a uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides mL⁻¹. O meio de fecundação foi TALP (Parrish et al., 1995). O sêmen apresentou uma motilidade entre 60% a 85% sendo usado de 5 a 15 μ l em cada gota (Figura 3).

Após a realização da FIV, as placas contendo os espermatozóides e os oócitos foram levados para a incubadora a uma temperatura 38,5° C, 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ e umidade saturada. O dia da FIV foi considerado dia 0.

Figura 3 – Pellet (círculo preto) obtido após centrifugação em gradiente Percoll 45/90.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021

Figura 4 – Sêmen (círculo preto) depositado na gota contendo os oócitos maturados (seta preta), para que ocorra a fecundação.



FONTE: Arquivo pessoal, 2021

4.4 CULTIVO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN VITRO* (CIV)

Posteriormente ao período da fecundação, foi realizado o cultivo dos zigotos, no qual eles foram pipetados com delicadeza fazendo a sua lavagem para a eliminação das células de

cumulus e espermatozoides mortos (Figura 4 e 5). Sendo colocados em placas contendo meio de cultivo e óleo mineral, levados para a incubadora a uma temperatura 38,5° C, 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ e umidade saturada.

Permanecendo na incubadora até o dia 4, no qual foram observados a sua taxa de clivagem, realizando a troca do meio SOFaaci (Holm et al., 1998) mantendo os embriões na mesma placa, permanecendo na incubadora a uma temperatura 38,5° C, 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ e umidade saturada, até o dia da previsão.

No Dia 6 foi realizada a previsão de quantos embriões foram produzidos, verificado como estava o seu desenvolvimento embrionário, e a última troca de meio, após a previsão, os embriões foram armazenados em microtubos com meio SOFaaci e óleo mineral, colocados em uma transportadora de oócitos a 37°C para transporte dos mesmos para a cidade de Buriticupu.

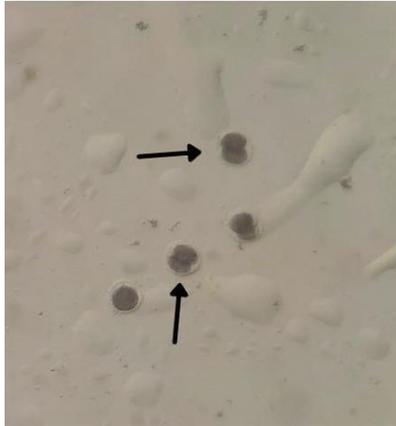
No dia 7 os embriões foram classificados (Figura 6) e envasados em um laboratório montado a campo (Figura 7), e colocados em transportadoras de embriões a uma temperatura de 37°C (Figura 8), e transferidos em dois dias de procedimento.

Figura 5 – Zigotos (setas pretas) antes do processo da lavagem no Cultivo *in vitro*.



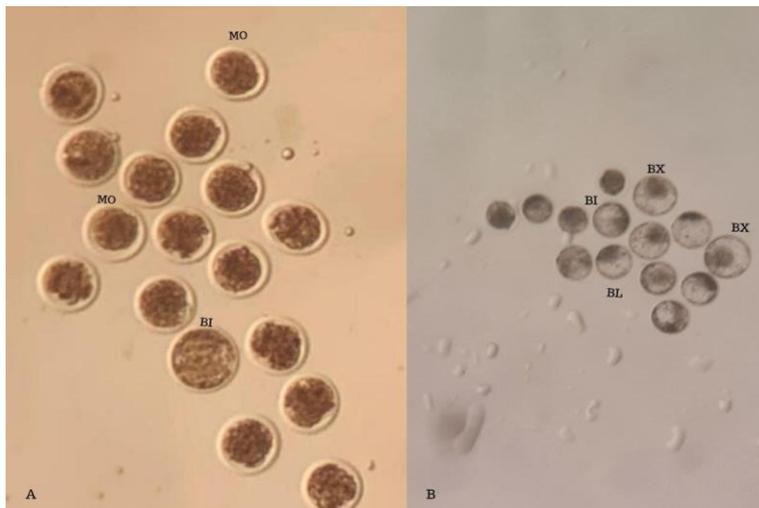
Fonte: Arquivo pessoal, 2021

Figura 6 – Zigotos (setas pretas) em estágio em divisão de duas células.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021

Figura 7 - Imagem A e B; Classificação dos embriões em MO, BI, BL e BX.



Fonte: Thaisa Cassiano, 2021

Figura 8 - Laboratório montado, no qual foi realizado o envase dos embriões.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021

Figura 9 - Embriões envasados, dentro da transportadora.



Fonte: Arquivo pessoal, 2021

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram aspirados um total de 1.830 oócitos cujo deste 1.410 oócitos eram viáveis, foram 50 doadoras, com uma média de 28,2 oócitos por doadora, que se enquadram nos dados de oócitos aspirados da raça zebuínas de 18 a 25 oócitos/sessão de OPU encontrado por Pontes (2010). Em relação à classificação dos CCOS, podemos observar no quadro 1, a quantidade de oócitos viáveis, total e sua classificação, sendo elas separadas por doadoras prenhas e vazias.

Quadro 1 - Quantidade de oócitos aspirados conforme sua classificação em Grau I, II, III, descarte, citoplasma irregular (CIT), total de oócitos viáveis e total de oócitos aspirados.

	Total de oócitos aspirados	Oócitos de Grau I (%)	Oócitos de Grau II (%)	Oócitos de Grau III (%)	Desnudo	CIT	Total de oócitos viáveis (%)
Doadora vazia	1.197	18 (1,5%)	187 (15,6%)	732 (61,1%)	114	149	938 (78,3%)
Doadora prenha	633	13 (2%)	114 (18%)	345 (54,5%)	62	99	472 (74,6%)
Total	1.830	31 (1,6%)	301 (16,4%)	1.077 (58,8%)	176	248	1.410 (77%)

Fonte: Autor, 2021

A porcentagem é sobre o total de oócitos aspirados.

Podemos observar que os oócitos de Grau I e II, das doadoras prenhas obteve-se um percentual maior que as doadoras vazias, demonstrando destas formas a viabilidade da aspiração folicular das doadoras prenhas. Segundo Mello (2016), doadoras que estejam em até o seu terceiro mês de gestação podem ser aspiradas. Assim corroborando que elas têm mais qualidade em seus oócitos, que se dá pela presença do corpo lúteo (CL) nesta sua fase gestacional. Devido ao CL que está presente no ovário aumentar a vascularização do ovário no qual irá proporcionar um ambiente nutricional e hormonal melhor para o desenvolvimento dos folículos (Penitente-Filho et al.2014).

Entretanto, quanto aos oócitos de Grau III as doadoras vazias demonstraram uma porcentagem superior, deve-se ressaltar que as doadoras vazias têm 16 doadoras a mais que as prenhas, o que poderá ter feito com que este percentual seja superior.

Porém, quando analisamos os oócitos tanto viáveis sobre o total de oócitos aspirados, as doadoras vazias obtiveram percentual maior, na qual as doadoras vazias tiveram 78,3% enquanto as doadoras prenhas 74,6%, não proporcionando assim uma diferença significativa entre as doadoras, que também foi observado no estudo de Barbosa (2013) não havendo esta diferença de forma significativa quando analisados em um todo.

No quadro 2, podemos acompanhar as taxas do processo de fecundação, através da avaliação da clivagem destes zigotos. Pode ser observado que a taxa de clivagem de doadoras prenhas foi superior às doadoras vazias. Quando observamos a previsão dos embriões que deverão ser envasados no dia seguinte, notamos que também houve diferença, na qual a previsão das doadoras prenhas obteve 21,6% de desenvolvimento embrionário, enquanto as doadoras vazias 16,4%. Para Barbosa (2013) doadoras gestantes apresentaram melhor desenvolvimento embrionário, esta pode ser a justificativa das doadoras prenhas terem um percentual 5,2% a mais que as doadoras vazias.

Com isso observou-se que as doadoras prenhas tem oócitos de melhores qualidades para o desenvolvimento embrionário, enquanto as doadoras vazias apresentam um quantitativo maior, pois nos oócitos viáveis as doadoras vazias apresentaram 78,3% enquanto as doadoras prenhas 74,6%.

Quadro 2 - Quantitativo de zigotos cultivados e clivados. Previsão de embriões produzidos.

	Cultivo dos zigotos (%)	Clivagem desenvolvimento embrionário (%)	Previsão de embriões produzidos (%)
Doadoras Vazias	1.053 (88%)	811 (77%)	154 (16,4%)
Doadoras Prenhas	538 (85%)	426 (79,2%)	102 (21,6%)
Total	1.591 (86,8%)	1.237 (77,7%)	256 (18,2%)

Fonte: Autor, 2021.

A porcentagem dos cultivados em relação aos oócitos totais aspirados, a clivagem com relação aos cultivados e a previsão aos totais de oócitos viáveis.

Os embriões produzidos se enquadram na classificação de MO, BI, BL e BX que podem ser observados no quadro 3.

Quadro 3 - Classificação dos embriões produzidos, sendo eles classificados em Mórula (MO), Blastocisto Inicial (BI), Blastocisto (BL) e Blastocisto Expandido (BX).

	MO	BI	BL	BX	Total de Embriões Produzidos (%)
Doadoras Vazias	75 (22%)	175 (51,6%)	54 (15,9%)	35 (10,3%)	339 (36,1%)
Doadoras Prenhas	14 (7,9%)	111 (62,7%)	36 (20,3%)	16 (9%)	177 (37,5%)
Total	89 (17,2%)	286 (55,4%)	90 (17,4%)	51 (9,9%)	516 (36,6%)

Fonte: Autor, 2021.

Porcentagem do total dos embriões produzidos é sobre o total de oócitos viáveis, é a de cada classificação dos embriões é sobre o total de embriões produzidos.

Observamos que a maior produção de embriões foi a da classificação BI para as duas categorias de doadoras, sendo as vazias 51,6% e penhas 62,7%, entretanto as doadoras vazias apresentaram maior produção de MO e BX. Enquanto as doadoras penhas tiveram sua maior produção de BI e BL, demonstrando desta forma que ela poderá ter uma produção menor quantitativamente, porém, com sua qualidade superior, pois produziu embriões de melhor desenvolvimento.

No total de embriões produzidos as doadoras penhas obtiveram 37,5% enquanto as vazias 36,1%, tendo assim as doadoras penhas produzido mais embriões, mesmo que esta diferença não tenha sido tão significativa. Este mesmo resultado de doadoras penhas terem produzido mais embriões viáveis foi relatado por Barbosa (2013), no qual as doadoras gestantes obtiveram 40,15% e as não gestantes 24,77% de embriões produzidos em seu estudo. Este resultado obtido contradiz com o resultado encontrado por SUGULLE et al. (2008) pois ele relata que não encontrou diferença significativa entre as doadoras.

Quadro 4 - Quantidade de oócitos qualidade aspirados e total de produção de embriões obtidos a partir destes oócitos.

	Oócitos Viáveis	Total de Embriões Produzidos
Doadoras Vazias	938	339 (36,1%)
Doadoras Prenhas	472	177 (37,5%)
Total	1410	516 (36,6%)

Fonte: Autor, 2021.

Porcentagem dos embriões produzidos e sobre os oócitos viáveis.

O quadro 4 traz um comparativo da quantidade de oócitos aspirados viáveis com a quantidade de embriões que foram produzidos. Demonstrando que as doadoras vazias teve uma produtividade de 36,1%, enquanto as doadoras prenhas teve uma produtividade 1,4% superior dando um total de produção de 37,5%, desta verificou que as doadoras prenhas produz oócitos de melhores qualidades e embriões se sobressai na qualidade quando olhamos as doadoras vazias, como foi visto por Takuma et al. (2010) que obteve melhor desempenho tanto na qualidade de oócitos com o desenvolvimento embrionário nas doadoras gestantes do que nas doadoras não gestantes.

No geral obteve-se uma produtividade de 36,6% se enquadrado em um índice aceitável, sendo uma porcentagem superior encontrada por Stroud e Callesesn (2012), de obteve uma taxa de 31,4% e 32% respectivamente. Tendo uma produção de 10,32 embriões por doadora/OPU, que é um resultado superior encontrado por Ponte 2011 em seus estudos, onde obteve uma produção de 8 embriões por sessão de OPU.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A reprodução *in vitro* tem sido largamente utilizada para garantia de melhoramento genético. Estabelecer procedimentos que sejam significativamente eficientes é deveras ser pertinente. No entanto, considerar verificar a raça do animal também pode ser fator pertinente para a avaliação desse processo. Tendo isso em vista, este estudo objetivou trazer um relato de caso de um comparativo da produção dos embriões de doadoras vazias e prenhas da raça Nelore de uma propriedade e em um acompanhamento durante o estágio.

Verifica-se que inúmeros fatores, ambientais e não ambientais, influenciam o processo de coleta de oócitos que, por sua vez, acabam influenciando a produção *in vitro* e a geração de embriões. Desde a sazonalidade às estações do ano, elemento que ainda carecem e profundamente e estudos mais especializados na área, até a própria genética do animal. Considerar estes fatores é de extrema importância à garantia de resultados mais positivos quanto ao processo de reprodução *in vitro* no Brasil.

Destaca-se que a raça Nelore apresenta sim melhores resultados para com o processo de produção *in vitro*, ainda que alguma literatura que estude a raça aponte resultados inferiores. Verifica-se que, possivelmente, o melhoramento genético aplicado à raça, possa ter promovido tais melhorias. Sugere-se que o estabelecimento de um protocolo que busque estabelecer melhores condições ambientais junto ao processo agropecuário possa impactar positivamente nesse processo.

Com base dos achados neste relato de caso pode-se concluir que as doadoras vazias produziram mais oócitos viáveis no total, entretanto as doadoras prenhas produziram mais oócitos de melhor classificação, sendo eles Grau I e II. As doadoras prenhas obtiveram melhores resultados quanto a clivagem dos zigotos, desenvolvimento embrionário (previsão) e embriões produzidos, do que as doadoras vazias. Nos embriões produzidos observou maior produção de Blastocisto Inicial (BI), gerado pelas doadoras prenhas.

A taxa de produção de embriões se enquadrou dentro da literatura, tanto pelas doadoras como na produção geral de embriões, ficando dentro do esperado. Como neste relato de caso não obtive a informação se a doadoras vazias tenham ou não a presença do corpo lúteo em seus ovários, poderá se implicar futuras análises utilizando esta informação.

Destaca-se, ainda, que questões como herdabilidade, variabilidade genética e potencial genético de fêmeas da raça Nelore apresentam resultados relativamente excelente, o que pode

acabar indicando o motivo pelo sucesso da reprodução *in vitro* e na geração de embriões. Compreende-se que a pesquisa apresenta limitações quanto ao seu método, tendo em vista o tempo e a disponibilidade de recursos, mas sugere-se que estudos futuros deem enfoque aos fatores ambientais inclusive, buscando averiguar todos os pontos que impactam sobre a reprodução animal.

REFERÊNCIAS

ADAYEMO, O.; HEATH, E. Plasma progesterone concentrations in *bos taurus* and *bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 14. P. 420-422, 1980.

ALVES, J. D. R.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; CALDAS, J. G. L.; FILHO, A. S. S.; BARRETO, M. B. P. Altas concentrações de FSH-p na maturação in vitro de oócitos *Bos indicus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 645-649, 2001.

ALVES, J. D. R.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; CALDAS, J. G. L.; FILHO, A. S. S.; BARRETO, M. B. P. Altas concentrações de FSH-p na maturação in vitro de oócitos *Bos indicus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 645-649, 2001.

AVELINO, K.B., VANTINI, E., SENEDA, M.M., et al. In vitro production of embryos of cows with acquired infertility. **Theriogenology**, [s.l.], v.57, p.656, 2002.

AVELINO, K.B., VANTINI, E., SENEDA, M.M., et al. In vitro production of embryos of cows with acquired infertility. **Theriogenology**, [s.l.], v.57, p.656, 2002.

BARUSELLI, PS, ELLIFF, FM, SILVA, LG, CATUSSI, BLC, BAYEUX, B. Estratégias para aumentar a produção de embriões em bovinos. **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA2019)**; Gramado, RS, 15 a 17 de maio de 2019.

BARUSELLI, PS, ELLIFF, FM, SILVA, LG, CATUSSI, BLC, BAYEUX, B. Estratégias para aumentar a produção de embriões em bovinos. **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA2019)**; Gramado, RS, 15 a 17 de maio de 2019.

BELTRAME, R. T. et al. ESTUDO DA EVOLUÇÃO DAS BIOTÉCNICAS DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES E FERTILIZAÇÃO IN VITRO NA RAÇA NELORE NO BRASIL. **B. Industr.anim.**, v.67, n.1, p.01-08, 2010.

BELTRAME, R. T. et al. ESTUDO DA EVOLUÇÃO DAS BIOTÉCNICAS DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES E FERTILIZAÇÃO IN VITRO NA RAÇA NELORE NO BRASIL. **B. Industr.anim.**, v.67, n.1, p.01-08, 2010.

BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L.R. Advances in reproductive technologies in cattle from artificial insemination to cloning. **Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 184-94, 2009.

BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L.R. Advances in reproductive technologies in cattle from artificial insemination to cloning. **Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 184-94, 2009.

CARVALHO, T. B. de; ZEN, S. D. A cadeia de Pecuária de Corte no Brasil: evolução e tendências. **Revista IPECEGE**, v. 3, n. 1, p. 85-99, 2017.

CARVALHO, T. B. de; ZEN, S. D. A cadeia de Pecuária de Corte no Brasil: evolução e tendências. **Revista IPECEGE**, v. 3, n. 1, p. 85-99, 2017.

CASTRO, F. C.; FERNANDES, H.; LEAL, C. L. V. Sistemas de manejo para maximização da eficiência reprodutiva em bovinos de corte nos trópicos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 25, n. 1, p. 041-061, 2018.

CASTRO, F. C.; FERNANDES, H.; LEAL, C. L. V. Sistemas de manejo para maximização da eficiência reprodutiva em bovinos de corte nos trópicos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 25, n. 1, p. 041-061, 2018.

CHIAN, R. C., LIM, J. H., TAN, S. L. State of theart in in-vitro oocyte maturation. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol**, [s.l.], v.16, p.211-219, 2004.

CHIAN, R. C., LIM, J. H., TAN, S. L. State of theart in in-vitro oocyte maturation. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol**, [s.l.], v.16, p.211-219, 2004.

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

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

DUARTE, M. S. O. **Avaliação econômica de biotécnicas reprodutivas em um rebanho de bovinos leiteiros**. 2019, 39 f. Monografia (Curso de Zootecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

DUARTE, M. S. O. **Avaliação econômica de biotécnicas reprodutivas em um rebanho de bovinos leiteiros**. 2019, 39 f. Monografia (Curso de Zootecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Qualidade da carne bovina, jun. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-bovina>. Acesso em: 16 jun. 2021.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Qualidade da carne bovina, jun. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-bovina>. Acesso em: 16 jun. 2021.

FIRETTI, S. M. G. **Efeito Da Contagem De Folículos Antrais Na Produção In Vitro De Embriões De Vacas Das Raças Nelore E Girolando**. 2017.

FISSORE, R. A., KUROKAWA, M., KNOTT, J., ZHANG, M., SMYTH, J. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. **Reproduction**, [s.l.], v.124, p.745-754, 2002.

FISSORE, R. A., KUROKAWA, M., KNOTT, J., ZHANG, M., SMYTH, J. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. **Reproduction**, [s.l.], v.124, p.745-754, 2002.

Garcia SM, Lunardelli PA, Anastacio M, Ancioto KL, Otávio J, Silva F, Oliveira EC DE, Zangirolamo AF, Seneda MM. Avaliação da taxa de blastocisto e prenhez de embriões produzidos in vitro em decorrência da contagem de folículos antrais em vacas da raça Girolando. **Rev Acad Ciênc Anim**, v.15(Supl.2), p.S67-67, 2017.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Produção Animal**, v. 31, n. 2, p. 212-217, 2007.

GONÇALVES, R. L. R.; VIANA, J. H. M. **Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo**. Gramado: Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA-2019), 2019.

HARDY, K., WRIGHT, C. S., FRANKS, S., WINSTON, R. M. L. In vitromaturation of oocytes. **BrMed Bull**, v.56, p.588-602, 2000.

HARDY, K., WRIGHT, C. S., FRANKS, S., WINSTON, R. M. L. In vitromaturation of oocytes. **BrMed Bull**, v.56, p.588-602, 2000.

HOLM, P.; SHUKRI, N. N.; VAJTA, G.; BOOTH, P.; BENDIXEN, C.; CALLESEN, H. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. **Theriogenology**, v. 50, p. 1285-99, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Trimestrais da pecuária - primeiros resultados: cai o abate de bovinos e cresce o de suínos e de frangos no 1º trimestre de 2021. **Agência IBGE Notícias**, mai. 2021. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/30720-trimestrais-da-pecuaria-primeiros-resultados-cai-o-abate-de-bovinos-e-cresce-o-de-suinos-e-de-frangos-no-1-trimestre-de-2021>. Acesso em: 16 jun. 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Trimestrais da pecuária - primeiros resultados: cai o abate de bovinos e cresce o de suínos e de frangos no 1º trimestre de 2021. **Agência IBGE Notícias**, mai. 2021. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/30720-trimestrais-da-pecuaria-primeiros-resultados-cai-o-abate-de-bovinos-e-cresce-o-de-suinos-e-de-frangos-no-1-trimestre-de-2021>. Acesso em: 16 jun. 2021.

KALANTARI, A.S.; CABRERA, V.E. Stochastic economic evaluation of dairy farm reproductive performance. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 95, p. 59-70, 2015.

KALANTARI, A.S.; CABRERA, V.E. Stochastic economic evaluation of dairy farm reproductive performance. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 95, p. 59-70, 2015.

LOIOLA, M. V. G.; CHALHOUB, M.; RODRIGUES, A. S.; FERRAZ, P. A.; BITTE; BITTENCOURT, R. F.; FILHO, A. L. R. Validação de um programa de produção in vitro de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 15, n. 1, p. 93-101, jan./mar. 2014.

LUEDKE, F. E.; LAVACH, F. L.; CASSANTA, F. G.; NUNES, L. F. do N.; SCHLOTEFELDT, C.; PAIVA, S. M. de; SANTOS, S. I. dos; NEVES, A. P. Aspectos da produção in vitro de embriões bovinos no Brasil–revisão. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 25, n. 1/2, p. 120-132, 2019.

LUEDKE, F. E.; LAVACH, F. L.; CASSANTA, F. G.; NUNES, L. F. do N.; SCHLOTEFELDT, C.; PAIVA, S. M. de; SANTOS, S. I. dos; NEVES, A. P. Aspectos da produção in vitro de embriões bovinos no Brasil–revisão. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 25, n. 1/2, p. 120-132, 2019.

MACHADO, G.M. **Efeito de diferentes protocolos de percoll na qualidade espermática e na produção in vitro de embriões**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G.; MELLO, M. R. B.; PALHANO. Fatores ligados à doadora que influenciam na produção de embriões in vitro (PIVE). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 40, n. 2, p. 51-57, abr./jun. 2016

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

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

MERTON, J. S. et al. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up–in vitro production embryo-production program. **Theriogenology**, v. 72, n. 7, p. 885-893, 2009.

NASCIMENTO, V. A. et al. A inseminação artificial em tempo fixo e a produção *in vitro* de embriões em vacas da raça nelore. In: COLÓQUIO ESTADUAL DE PESQUISA MULTIDISCIPLINAR, 2., 2017, Mineiros. **Anais [...]**. Mineiros: Centro Universitário de Mineiros, 2017.

NEVES, S. et al. Influência das condições climatológicas nas variáveis reprodutivas de fêmeas bovinas da raça nelore. In: ENCONTRO NACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA UNICESUMAR, 9., 2015, Maringá. **Anais eletrônicos [...]**. Maringá: UniCesumar, 2015. P. 4-8.

NEVES, S.; CAVALIERI, F. L. B.; EMANUELLI, I. P. Influência das condições climatológicas nas variáveis reprodutivas de fêmeas bovinas da raça Nelore. In: VIII MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA I MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS DE INICIAÇÃO TECNOLÓGICA E INOVAÇÃO, **Anais... UNICESUMAR** – Centro Universitário de Maringá, Paraná, Brasil, 2016.

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, 52 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 175). 2014.

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, 52 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 175). 2014.

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

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

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim up or percoll method on success in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, p. 859-869, 1995.

PEIXOTO, M. G. C. D.; PEREIRA, C. S.; BERGMANN, J. A. G.; PENNA, V. M.; FONSECA, C. G. Genetic parameters of multiple ovulation traits in Nellore females. **Theriogenology**, v.62, n. 8, p.1459-1464, 2004.

PENITENTE-FILHO, J. M.; CARRASCAL, E.; OLIVEIRA, F. A.; ZOLINI, A. M.; OLIVEIRA, C. T.; SOARES, I. A. C.; TORRES, A. A. Influence of Dominant Follicle and Corpus luteum on Recovery of Good Quality Oocytes for In vitro Embryo Production in Cattle. **British Biotechnology Journal**, v. 4, n. 12, p. 1305-1312, 2014.

PEREIRA FILHO, J. M.; OLIVEIRA, F. A.; TORRES, C. A. A. PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS IN VIVO E IN VITRO. In: SEMANA DO FAZENDEIRO, 83., 2012. **Anais eletrônicos** [...]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2012.

PEREZ, B. C.; PEIXOTO, M. G. C. D.; BRUNELI, F. T.; RAMOS, P. V. B.; BALIEIRO, J. C.C. Parâmetros genéticos para características relacionadas à produção de oócitos e embriões em doadoras da raça Guzerá. In: Embrapa Gado de Leite-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 52, 2015, Belo Horizonte. Zootecnia: otimizando recursos e potencialidades: **Anais...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2015.

PINHEIRO, A. K. **Parâmetros Produtivos E Genéticos Da Produção In Vitro De Embriões Em Bovinos Nelore No Acre**. 2019, 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Acre, Rio Branco, 2019.

PINHO, G. A. S. de. **Índices De Recuperação De Oócitos E Produção De Embriões Por Fecundação In Vitro Nas Raças Gir Leiteiro, Holandês E Girolando**. 2019, 16 f. Monografia (Curso de Medicina veterinária) - Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac, Gama, 2019.

Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GMG, Sanches B V., Porcionato JPF, Vieira PHS, Faifer FS, Sterza FAM, Schenk JL, Seneda MM. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v.74, n.8, p.1349-1355, 2010.

PONTES, J. H. F.; MELLO 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.9, p.1640-1646, 2011.

RUBIN, K. C. P. **Particularidades reprodutivas da raça nelore na produção *in vitro* em embriões (PVE)**. 2006, 54 f. Dissertação (mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

SALATI, P. Rebanho de bovinos tem leve alta no Brasil em 2019, após 2 anos de queda. **G1 Agro**, out. 2020. Disponível em: <https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2020/10/15/rebanho-de-bovinos-tem-leve-alta-no-brasil-em-2019-apos-2-anos-de-queda.ghtml>. Acesso em: 16 jun. 2021.

SALATI, P. Rebanho de bovinos tem leve alta no Brasil em 2019, após 2 anos de queda. **G1 Agro**, out. 2020. Disponível em: <https://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2020/10/15/rebanho-de-bovinos-tem-leve-alta-no-brasil-em-2019-apos-2-anos-de-queda.ghtml>. Acesso em: 16 jun. 2021.

SARTORELLI E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, p. 2382-2394, 2005.

Sartori R, Gimenes LU, Monteiro PLJ, Melo LF, Baruselli PS, Bastos MR. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. **Theriogenology**, v.86, n.1, p.32-40, 2016.

SERAFIM, P. R. **Sêmen sexado bovino: a produção de embriões *in vitro* é influenciada pelo touro doador do material genético?** 2017, 35 f. Monografia (Curso de Medicina Veterinária) – Universidade Santo Amaro (UNISA) São Paulo, 2017.

SERAFIM, P. R. **Sêmen sexado bovino: a produção de embriões *in vitro* é influenciada pelo touro doador do material genético?** 2017, 35 f. Monografia (Curso de Medicina Veterinária) – Universidade Santo Amaro (UNISA) São Paulo, 2017.

SILVA, R. R.; VULCANI, V. A. S.; CAMARGOS, A. S.; COSTA, U. R. da; DUTRA, M. M.; CHIARI, J. R. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte. *Colloquium Agrariae*, vol. 13, n. Especial, p. 402-415, 2017.

SOUZA, A. C. C. et al. Influência da contagem de folículos antrais na produção in vitro de embriões bovinos de doadoras *Bos indicus* e *Bos taurus* – Revisão de literatura. **Revista Brasileira de reprodução Animal**, v. 43, n. 1, p. 13-17, 2019.

SOUZA, N. S. de; ABADE, C. C. Produção In Vitro de Embriões Bovinos: Etapas De Produção E Histórico No Brasil. **Ciência Veterinária UniFil**, v. 1, n.3, p. 95-108, 2018.

SOUZA, N. S. de; ABADE, C. C. Produção In Vitro de Embriões Bovinos: Etapas De Produção E Histórico No Brasil. **Ciência Veterinária UniFil**, v. 1, n.3, p. 95-108, 2018.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. de A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Produção Animal**, v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B. PALHAO, M. P. CAMARGO, L. S. A. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. *Animal Reprodução*, v.9, n.1, p.12-18, 2012.