

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

Relatório do Estágio Curricular em Prática Veterinária realizado junto à Vitrogen, Cravinhos, São Paulo.

Caso de interesse: Aspiração folicular guiada por ultrassonografia e produção *in vitro* de embriões de doadoras da raça Nelore.

Isadora Beraldo Giacometti

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Relatório do Estágio Curricular em Prática Veterinária apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, Unesp, para graduação em Medicina Veterinária

JABOTICABAL – S.P.

2º semestre/2025

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR EM PRÁTICA
VETERINÁRIA REALIZADO JUNTO À VITROGEN, CRAVINHOS, SÃO
PAULO.

Caso de interesse: Aspiração folicular guiada por ultrassonografia e
produção *in vitro* de embriões de doadoras da raça Nelore.

Isadora Beraldo Giacometti

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte
Supervisora: Aline de Souza Oliveira

JABOTICABAL – S.P.
2º SEMESTRE DE 2025

G429r	Giacometti, Isadora Beraldo Relatório final do estágio curricular em prática veterinária, realizado junto à Vitrogen, Cravinhos, São Paulo. Caso de interesse: Aspiração folicular guiada por ultrassonografia e produção in vitro de embriões de doadoras da raça Nelore. /Isadora Beraldo Giacometti. -- Jaboticabal, 2025 35 p. : tabs., fotos Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: José Maurício Barbanti Duarte 1. Reprodução animal. 2. Embriões. 3. Bovinos Reprodução. I. Título.
-------	--

Isadora Beraldo Giacometti

**Relatório do Estágio Curricular em Prática Veterinária realizado junto à Vitrogen.
Caso de interesse: Aspiração folicular guiada por ultrassonografia e produção *in vitro* de
embriões de doadoras da raça Nelore.**

Relatório de Estágio Curricular em Prática Veterinária apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

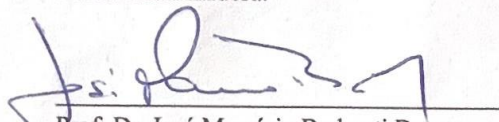
Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Área de Concentração: Reprodução animal

Data da defesa: 11/12/2025

☒ Aprovado
☐ Reprovado

Banca Examinadora:



Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal



Me. Daniele Campos Araújo
Vitrogen



Me. Bianca Ferrari

UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal

Documento assinado digitalmente



PAOLA CASTRO MORAES

Data: 15/12/2025 12:40:14-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Caio José Xavier Abimussi
CEGRA

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Sidney e Ana, pelo apoio incondicional durante todos esses anos, por terem dado muito mais do que poderiam para que eu realizasse um sonho que eles tomaram como deles. À minha irmã, Isabela, companheira da minha vida toda, que esteve do meu lado em todos os momentos, sendo bons ou ruins, tornando-os melhores e sempre me incentivando. Aos meus avós, João, Clarice e Julieta, que sempre foram imagens de carinho e auxílio, sempre me deram todo o apoio que eu precisava, tornando meu sonho possível. Aos meus padrinhos, Silvana e João, que sempre me ajudaram. À minha tia Cristina, que foi uma grande companheira durante todo esse caminho.

Agradeço ao Professor Doutor José Maurício Barbanti Duarte, que me aceitou como parte do Nupecce como iniciação científica e como orientanda de estágio curricular e que me ensinou muito ao longo desse caminho e a toda a equipe do Nupecce pelos ensinamentos e companheirismo.

À Yeda Watanabe, que abriu as portas da Vitrogen para mim e sempre me tratou com tanto carinho e cuidado, que me ensinou muito durante o estágio e me deu muitas oportunidades; à toda equipe da Vitrogen, Aline, Daniele, Fernando, Kris e Ricardo, por tudo que me ensinaram e por toda a paciência comigo nesse aprendizado. Ao médico veterinário Rodolfo, que permitiu que eu o acompanhasse em seu trabalho e me ensinou muito.

Agradeço aos meus amigos, Daniele Gandra, Júlia Diez, Leonardo Prandi, Janaina Matos, Isabella Ito, Adrian Felipe, Cintia Sala, Isabelle Fumagalli e Barbara Bueno, que sempre estiveram comigo em todos os momentos dessa jornada e que fizeram com que cada dia, mesmo os mais difíceis, fossem mais alegres.

Por fim, agradeço à Unesp, por ter sido um lar durante os cinco anos de graduação, permitindo que eu não apenas adquirisse os conhecimentos necessários para ser uma verdadeira profissional, como também vivesse momentos inesquecíveis.

Sumário

I. Relatório de Estágio	10
1. Introdução	10
2. Descrição do local de estágio	10
3. Descrição das atividades desenvolvidas.....	14
4. Discussão das atividades desenvolvidas	19
5. Considerações finais.....	20
II. Monografia.....	20
1. Introdução.....	20
2. Revisão de literatura	22
2.1 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia	22
2.2 Etapas da PIVE.....	23
2.3 Classificação dos embriões	24
2.4 Transferência de embriões a fresco	25
2.5 Criopreservação.....	26
3. Relato de caso	26
4. Discussão	31
5. Conclusão	32
6. Referências bibliográficas.....	33

Lista de Figuras

Figura 1. Fachada da empresa Vitrogen, localizada na avenida Coronel José Nogueira Terra, 203, em Cravinhos, São Paulo. Fonte: Arquivo da Vitrogen.....	11
Figura 2. Sala de Limpeza e Esterilização, equipada com autoclave e estufas secadoras. Fonte: Arquivo pessoal.	12
Figura 3. Sala de treinamento equipada com três fluxos laminares (A e C), incubadoras (B) e dois microscópios invertidos (D). Fonte: Arquivo pessoal.	13
Figura 4. Sala de produção comercial. A: Incubadoras de bancada EVE e incubadora de CO ₂ e fluxo laminar com lupa, mesa aquecedora, ponteiras e pipetadores. B: Dois fluxos laminares, um deles contendo lupa, mesa aquecedora, ponteiras, pipetadores e suporte para tubos. Fonte: Arquivo pessoal.	14
Figura 5. Discente realizando a produção <i>in vitro</i> de embriões a partir de oócitos aspirados de ovário de abatedouro. Fonte: Arquivo pessoal.	15
Figura 6. Fotos da produção da discente. A: oócitos maturados; B: zigoto em processo de clivagem no dia 3 de cultivo; C: blastocistos em diferentes estágios de desenvolvimento no dia 7 (seta azul: blastocisto, seta preta blastocisto expandido e seta vermelha: blastocisto em eclosão, saindo da zona pelúcida); D: blastocistos eclodidos, fora da zona pelúcida, no dia 10 de cultivo. Fonte: Arquivo pessoal, fotos tiradas através do estereomicroscópio.....	16
Figura 7. Representação gráfica da distribuição da <i>Produção de embriões in vitro</i> no período de estágio por raça de doadoras de oócitos.	18
Figura 8. Representação gráfica da distribuição do destino dos embriões produzidos no dia 7 de cultivo.	18
Figura 9. Procedimento de aspiração folicular sendo realizado por médico-veterinário, utilizando abordagem transvaginal guiada por ultrassonografia. Fonte: Arquivo pessoal.	19
Figura 10. Gráfico mostrando a produção mundial anual de embriões bovinos <i>in vitro</i> por continente. Fonte: Viana, 2024.	21
Figura 11. Classificação dos complexos cumulus-oócitos. Grau 1 (a, b, c, e), grau 2 (d,f), grau 3 (g) e grau 4 (h,i). Fonte: Sá Filho <i>et al.</i> , 2014.	23
Figura 12. Classificação da qualidade dos embriões bovinos segundo a IETS. Fonte: Viana, 2009.....	25
Figura 13. Bancada organizada com lupa, Labmix, mesa aquecedora, pipetadores, ponteiras, placas de petri, tubos, PBS e protocolo de OPU. Fonte: Arquivo Pessoal.....	27
Figura 14. A: OPU sendo realizada por médico veterinário. B: imagem ultrassonográfica mostrando ovário com folículos de diferentes tamanhos (setas). Fonte: Arquivo pessoal.	28
Figura 15. A: Filtragem do líquido folicular aspirado. B: Médico veterinário realizando a busca de oócitos. Fonte: Arquivo pessoal.	28

Lista de Tabelas

Tabela 1. Frequência das atividades realizadas durante o estágio.	14
Tabela 2. <i>Produção de embriões in vitro</i> realizadas pela estagiária no período de agosto a novembro e taxas de embriões totais e de eclosão dos blastocistos.	17

Lista de abreviações

CIV Cultivo *in vitro*

FIV Fecundação *in vitro*

FSH Hormônio folículo estimulante

LH Hormônio luteinizante

MIV Maturação *in vitro*

OPU *Ovum pick-up*

PIVE *Produção de embriões in vitro*

TE Transferência de Embriões

O₂ – Oxigênio

CO₂ – Dióxido de carbono

N₂ - Nitrogênio

I. Relatório de Estágio

1. Introdução

O estágio curricular obrigatório é uma etapa fundamental da formação profissional, pois permite a experiência prática dentro da área de interesse, garantindo ao discente a oportunidade de aprimorar os conhecimentos técnicos adquiridos ao longo da graduação e de se capacitar para a atuação no mercado de trabalho. É realizado durante o último semestre do curso de Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCAV, campus de Jaboticabal e exige um total de 600 horas.

O presente relatório descreve as atividades desenvolvidas pela discente Isadora Beraldo Giacometti, graduanda do décimo período do curso de Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FCAV, Campus de Jaboticabal, durante o Estágio Curricular em Prática Veterinária, realizado sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, docente do Departamento de Zootecnia da FCAV/Unesp.

O estágio foi realizado no laboratório de produção *in vitro* de embriões bovinos Vitrogen, em período integral, de 01 de agosto a 30 de novembro, perfazendo um total de 688 horas. As atividades desenvolvidas compreenderam toda a rotina laboratorial incluindo limpeza e aferição de incubadoras, manipulação de oócitos e embriões e todas as etapas da produção *in vitro* e criopreservação de embriões. Também foram acompanhadas aspirações foliculares e seleção de oócitos a campo, testes de novos lotes de meio de cultivo de embriões e avaliação de equipamentos. As atividades permitiram integrar prática laboratorial, procedimentos a campo e gestão de dados, proporcionando uma visão geral do processo produtivo.

2. Descrição do local de estágio

A Vitrogen (Figura 1) está localizada na Avenida Coronel José Nogueira Terra, 203, no município de Cravinhos, São Paulo. A empresa foi fundada há mais de 25 anos pela Dra. Yeda Watanabe e atua na área de biotecnologia da reprodução animal. Atualmente desenvolve atividades no Brasil e presta serviços para outros países.

Os principais públicos atendidos incluem criadores, médicos veterinários e laboratórios de reprodução assistida. Entre os serviços oferecidos estão a produção *in vitro* de embriões, a fabricação e comercialização de meios de cultivo, treinamentos voltados à capacitação técnica em produção de embriões e criopreservação, além de assessoria para implantação de laboratórios e unidades de reprodução animal. A empresa já participou da implantação de mais de 50 laboratórios em diferentes regiões da América Latina, América Central, América do Norte, Ásia e Oceania.



Figura 1. Fachada da empresa Vitrogen, localizada na avenida Coronel José Nogueira Terra, 203, em Cravinhos, São Paulo. **Fonte:** Arquivo da Vitrogen.

A equipe é composta pela fundadora e CEO, Dra. Yeda Watanabe, três médicos veterinários embriologistas, responsáveis pela produção de embriões e realizar os treinamentos e assessorias, uma médica veterinária encarregada pela gestão de dados e um químico responsável pela produção dos meios de cultivo que são comercializados e utilizados no laboratório.

A empresa apresenta sua estrutura física distribuída em dois pavimentos. No térreo, encontram-se a recepção, um banheiro e o laboratório, enquanto no pavimento superior localizam-se a copa, o setor administrativo, um escritório, uma sala de reuniões e um banheiro. O laboratório é dividido em diferentes ambientes, conforme as atividades desempenhadas.

A sala de recepção e manipulação é destinada ao recebimento de oócitos e demais materiais encaminhados por médicos veterinários que realizam a aspiração folicular a campo, bem como de ovários provenientes de abatedouros, utilizados em treinamentos e testes de qualidade. Nesse mesmo ambiente também é realizada a OPU desses ovários. A sala é equipada com mesa aquecedora, aquecedor de tubos, seringas, agulhas, gaze e luvas de procedimento, além de armários destinados ao armazenamento dos equipamentos utilizados no transporte de oócitos entre as propriedades e o laboratório, como Labmix (WTA®) e transportador de oócitos.

A empresa conta ainda com duas salas de estoques. Na primeira, encontra-se um cilindro de mistura gasosa (O_2 , CO_2 e N_2), utilizado para o abastecimento das Labmix (WTA®), além de bolsas de transporte e caixas para envase de meios de cultivo para envio aos clientes. O segundo estoque é onde são armazenados os materiais de uso rotineiro em laboratório, como luvas, placas, ponteiras, seringas, agulhas e tubos, bem como equipamentos como Labmix (WTA®), transportadores de

oócitos, transportadoras de embriões, congeladores de embriões e descongeladores de sêmen e embriões.

A sala de lavagem e esterilização é equipada com pia, autoclave e estufa de secagem e esterilização, sendo o ambiente destinado à higienização dos materiais utilizados nas atividades laboratoriais (figura 2). A sala de treinamento, por sua vez, é utilizada para a realização de treinamentos e atividades de pesquisa, possuindo três fluxos laminares, uma incubadora Thermo, uma incubadora de bancada EVE (WTA®), um estabilizador de meios ADAM (WTA®), três estereomicroscópios (lupas), mesas aquecedoras, um microscópio óptico, dois microscópios invertidos, uma mini centrífuga, pipetas com volumes de 10 a 1000 μL , racks aquecedores de tubos e três armários destinados ao armazenamento de materiais como placas, canetas, lâminas e lamínulas (figura 3).



Figura 2. Sala de Limpeza e Esterilização, equipada com autoclave e estufas secadoras. **Fonte:** Arquivo pessoal.



Figura 3. Sala de treinamento equipada com três fluxos laminares (A e C), incubadoras (B) e dois microscópios invertidos (D). **Fonte:** Arquivo pessoal.

O banco de amostras criopreservadas contém botijões de nitrogênio utilizados para o armazenamento de embriões produzidos e congelados, tanto por congelamento direto quanto por vitrificação, além de sêmen utilizado nos procedimentos de fertilização *in vitro* (FIV). O local dispõe de uma mesa para manipulação dos materiais, gavetas para armazenamento de racks, caixas de isopor utilizadas para manipulação dos sêmens e embriões criopreservados, e uma impressora de etiquetas para identificação das racks. O armazenamento é realizado em botijões identificados conforme o mapeamento elaborado pela empresa, garantindo a localização correta das palhetas.

A sala de PIVE comercial é equipada com fluxos laminares, uma incubadora Thermo, duas incubadoras de bancada EVE (WTA®), estereomicroscópios (lupas), mesas aquecedoras, microscópio óptico, mini centrífuga, pipetas de 10 a 1000 μL , racks aquecedores de tubos, armários para armazenamento de materiais e cilindro de mistura gasosa (Figura 4). Esse ambiente é destinado às atividades comerciais de produção *in vitro* de embriões. Por fim, a sala de preparação de meios de cultura é o local utilizado para o preparo e manipulação dos meios de cultivo empregados nas diferentes etapas do processo de produção *in vitro* de embriões.



Figura 4. Sala de produção comercial. **A:** Incubadoras de bancada EVE e incubadora de CO₂ e fluxo laminar com lupa, mesa aquecedora, ponteiras e pipetadores. **B:** Dois fluxos laminares, um deles contendo lupa, mesa aquecedora, ponteiras, pipetadores e suporte para tubos. **Fonte:** Arquivo pessoal.

3. Descrição das atividades desenvolvidas

Durante os quatro meses de estágio, foram executadas diversas atividades relacionadas às rotinas laboratoriais e aos procedimentos de produção *in vitro* de embriões (PIVE). As principais atividades e suas respectivas quantidades estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Frequência das atividades realizadas durante o estágio.

Atividade	Número de vezes acompanhado
Esterilização de materiais	4
Teste de lote de meios	8
Teste de equipamentos	10
Teste de sêmen/touros	3
Recebimento de oócitos	9
Preparo de material para seleção de oócitos a campo	9
Envio de embriões para transferência	7
Aspiração folicular e seleção de oócitos a campo	4

Às segundas-feiras eram realizadas a limpeza do laboratório e a aferição da temperatura e atmosfera gasosa incubadoras para controle, e ocorria o recebimento de ovários de abatedouro para realização da aspiração folicular e produção de embriões com o objetivo de testar novos lotes de meio para controle de qualidade da produção e para avaliar o funcionamento de equipamentos enviados pela assistência técnica da WTA. Ao todo foram testados 4 lotes de meios (cada um testado duas vezes), 6 incubadoras de bancada EVE (WTA®), um transportador de embriões, um transportador de oócitos e duas incubadoras portáteis Labmix (WTA®).

A discente pôde participar diretamente das produções dos testes (figura 5), desde a aspiração dos oócitos a partir dos ovários de abatedouro, rastreio e seleção de oócitos e maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. No início foi manipulada apenas uma única placa de poço onde eram realizadas todas as etapas da produção *in vitro* de embriões, avaliando a taxa de blastocisto produzidos do dia 7 ao dia 10 de cultivo e taxa de eclosão dos blastocistos (figura 6). Todas as etapas da produção foram realizadas em baixa tensão de oxigênio, ou seja, utilizando a mistura gasosa com 5% de oxigênio, 6% de dióxido de carbono e 89% de nitrogênio. O número de oócitos manipulados pela discente aumentou gradativamente até que obtivesse prática suficiente para a realização da produção dos testes sozinha. Ao todo, foram 17 produções realizadas pela estagiária no período de agosto a novembro (tabela 2).

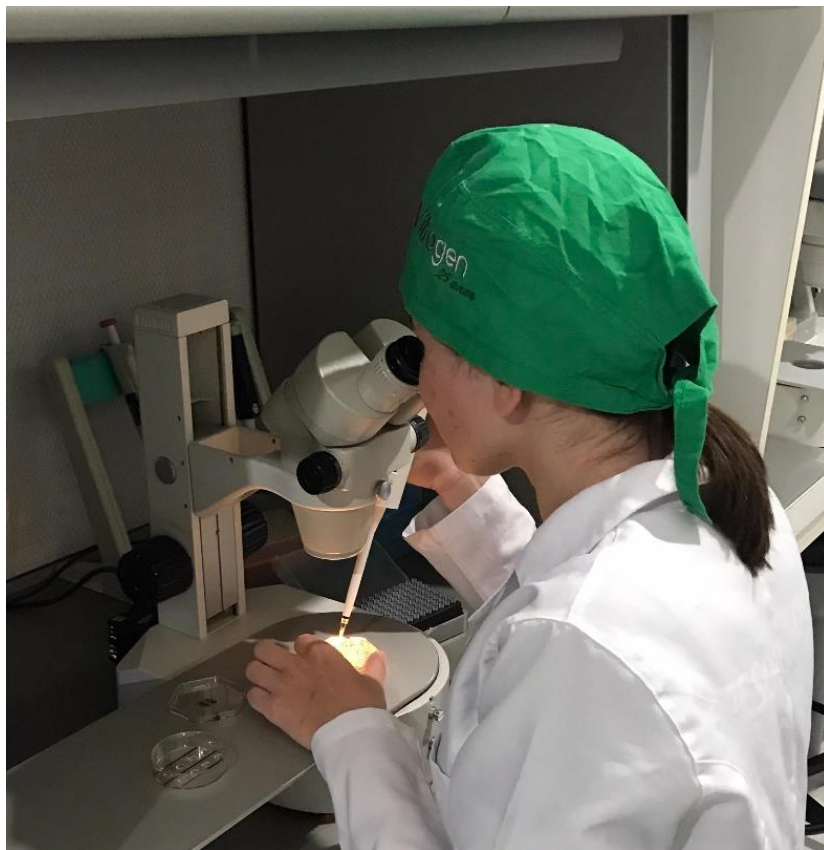


Figura 5. Discente realizando a produção *in vitro* de embriões a partir de oócitos aspirados de ovário de abatedouro. **Fonte:** Arquivo pessoal.

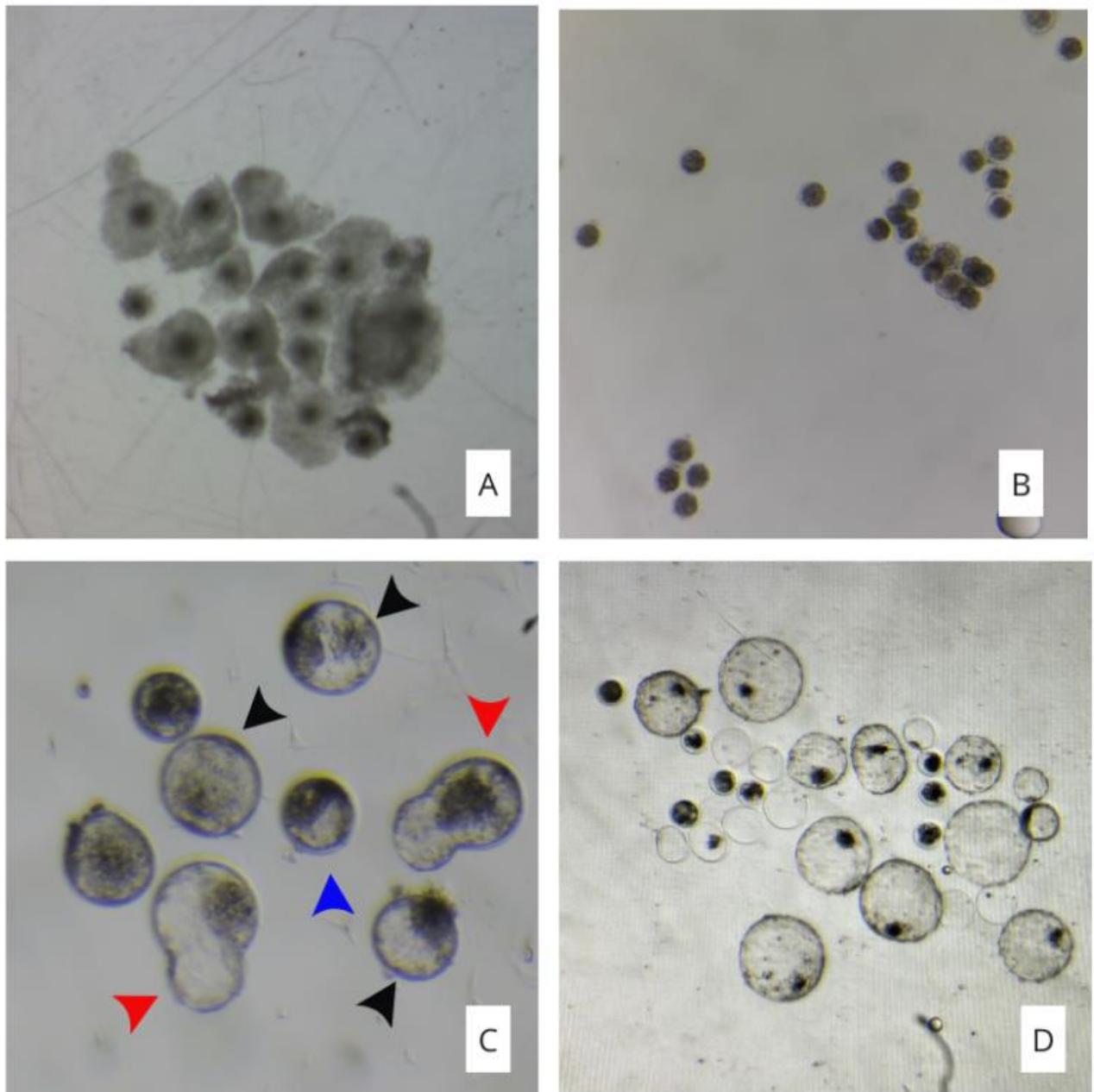


Figura 6. Fotos da produção da discente. **A:** oócitos maturados; **B:** zigoto em processo de clivagem no dia 3 de cultivo; **C:** blastocistos em diferentes estágios de desenvolvimento no dia 7 (seta azul: blastocisto, seta preta blastocisto expandido e seta vermelha: blastocisto em eclosão, saindo da zona pelúcida); **D:** blastocistos eclodidos, fora da zona pelúcida, no dia 10 de cultivo. **Fonte:** Arquivo pessoa, fotos tiradas através do estereomicroscópio.

Tabela 2. Produção de embriões *in vitro* realizadas pela estagiária no período de agosto a novembro e taxas de embriões totais e de eclosão dos blastocistos.

Data	Testes	Quantidade de touros utilizados	Número de oócitos viáveis	Embriões Totais (%)	Eclosão (%)
04/8	1	1	43	19%	100%
06/8	2	1	50	48%	96%
11/8	3	1	95	31%	90%
18/8	4	1	57	28%	75%
19/8	5	1	65	17%	73%
08/9	6	2	58	53%	90%
16/9	7	1	129	31%	85%
22/9	8	1	152	47%	80%
29/9	9	1	265	27%	58%
06/10	10	1	347	33%	82%
13/10	11	3	240	29%	70%
20/10	12	3	331	32%	62%
27/10	13	1	146	50%	85%
03/11	14	1	229	41%	80%
10/11	15	1	291	41%	78%
11/11	16	1	267	37%	81%
12/11	17	1	370	44%	94%

No setor comercial foi acompanhado o recebimento de oócitos, produção de embriões e preparo do material para a aspiração folicular *in vivo*, que consiste no envio dos meios de seleção e maturação de oócitos e do transportador de oócitos ou Labmix para o transporte dos oócitos até o laboratório. Durante o período de estágio, foi possível acompanhar a produção de embriões de diferentes raças bovinas (figura 7), bem como o envase de embriões no dia 7 de cultivo para transferência a fresco e a criopreservação dos embriões que não seriam transferidos (figura 8).

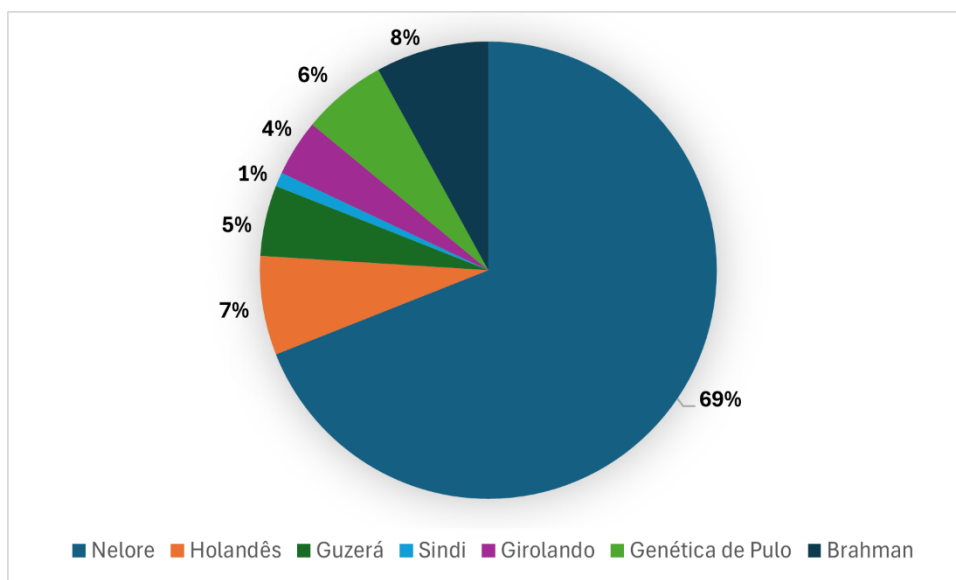


Figura 7. Representação gráfica da distribuição da *Produção de embriões in vitro* no período de estágio por raça de doadoras de oócitos.

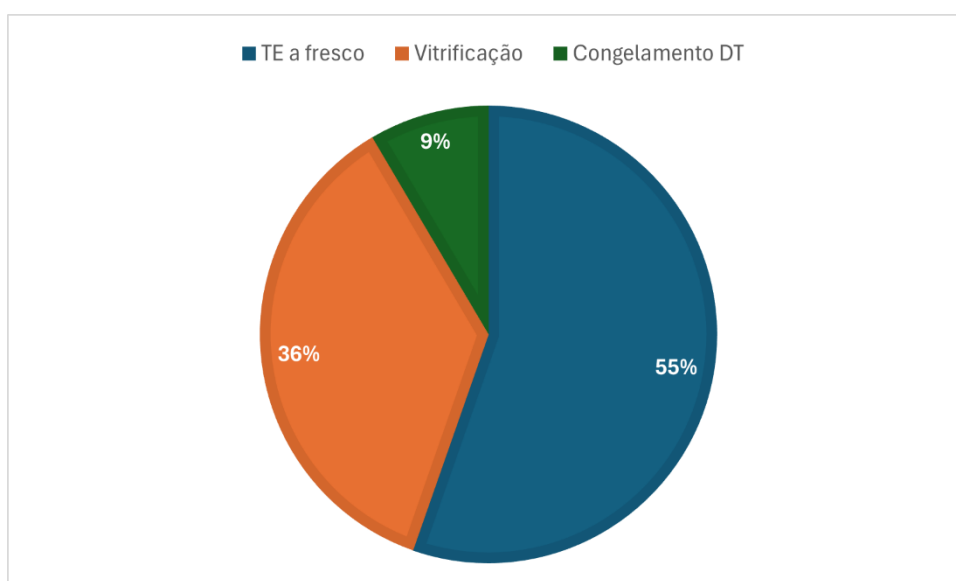


Figura 8. Representação gráfica da distribuição do destino dos embriões produzidos no dia 7 de cultivo.

Além das atividades laboratoriais, foram acompanhadas aspirações foliculares e seleção de oócitos a campo nas fazendas Colonial Serra, no Instituto de Zootecnia de Sertãozinho e na Agropecuária G Sales. Na Fazenda Colonial foram aspiradas 38 doadoras. No Instituto de Zootecnia, foram observados dois procedimentos, realizados em dias diferentes, ambos envolvendo a aspiração de 15 doadoras. Já na Agropecuária G Sales, foi realizada a aspiração de apenas uma vaca e foi permitido que a discente realizasse a seleção dos oócitos recuperados. A participação nessas rotinas permitiu acompanhar as etapas de execução da OPU (Figura 9), seleção dos

complexos cumulus-oócito e transporte dos oócitos ao laboratório, proporcionando uma visão aprofundada das demandas técnicas e logísticas da produção *in vitro* em ambiente de campo.



Figura 9. Procedimento de aspiração folicular sendo realizado por médico-veterinário, utilizando abordagem transvaginal guiada por ultrassonografia. **Fonte:** Arquivo pessoal.

Ademais, foram desempenhadas tarefas de elaboração de relatórios técnicos e organização de dados de produção após a realização de um teste de equipamento ou de qualidade dos lotes dos meios de cultivo de embriões e após finalizada uma produção de embriões no setor comercial, o que contribuiu para o acompanhamento dos resultados obtidos e para o controle de desempenho do laboratório.

4. Discussão das atividades desenvolvidas

A maior parte das atividades realizadas ocorreram no ambiente laboratorial, envolvendo principalmente o controle de qualidade dos lotes dos meios de cultivos de embriões e os testes de funcionamento e validação técnica de equipamentos, sendo que o tipo de equipamento mais testado foi a incubadora de bancada EVE (6 no total).

A participação da discente nas rotinas de produção *in vitro* de embriões evoluiu bastante ao longo do estágio. No início, ela manipulava apenas 43 oócitos viáveis, mas, conforme ganhou prática e segurança, passou a realizar todas as etapas do processo sozinha, chegando a trabalhar com 370 oócitos ao final do período. As variações observadas nas taxas de produção de embriões estavam relacionadas tanto à habilidade da aluna quanto ao tipo de teste, à qualidade dos oócitos e ao touro utilizado na fecundação. Em doze produções, as taxas foram superiores a 30%, com número de oócitos viáveis entre 48 e 370, indicando bom desempenho mesmo em

dias com maior volume de trabalho. As taxas de eclosão também foram satisfatórias, com a maioria dos experimentos apresentando valores acima de 80%.

No setor comercial, observou-se predominância da raça Nelore nas rotinas de produção *in vitro*, que corresponde a 69% da produção total. As demais raças aparecem com participação reduzida: Brahman (8%), Holandês (7%), Genética de Pulo (6%), Guzerá (5%), Girolando (4%) e Sindi (1%). Esses resultados demonstram que os clientes atendidos pelo laboratório trabalham principalmente com a raça Nelore. Quanto ao destino dos embriões produzidos, a maior parte dos embriões (55%) foi destinada à transferência a fresco, prática priorizada quando há receptoras sincronizadas aptas a receber os embriões e logística favorável, os demais embriões foram criopreservados. A vitrificação corresponde a 36% dos embriões, sendo maior que o congelamento DT (direct transfer), que corresponde a 9%, o que demonstra maior interesse pela técnica de congelamento rápido por parte dos clientes.

A participação nas atividades a campo permitiu observar diferentes realidades operacionais envolvidas na aspiração folicular (OPU). Na Fazenda Colonial Serra, foram aspiradas 38 doadoras, representando o maior número de doadoras aspiradas em um único dia e local, o que permitiu observar uma rotina mais extensa da OPU e seleção de oócitos. No Instituto de Zootecnia, a realização em dias diferentes, visto que as aspirações foram realizadas para projetos de mestrado, permitiu conhecer outras dinâmicas de trabalho, ampliando a compreensão sobre fatores que influenciam a eficiência da coleta de oócitos e, posteriormente, a produção *in vitro* de embriões. Já a aspiração na Agropecuária G Sales, apesar de ser uma doadora, foi possível realizar o rastreo e seleção dos oócitos aspirados, permitindo conhecer as diferenças entre a seleção de oócitos aspirados de vacas vivas e os aspirados a partir de ovários de abatedouro.

5. Considerações finais

O estágio em um laboratório comercial proporcionou uma experiência ampla e prática nas atividades de produção *in vitro* de embriões (PIVE), permitindo desenvolver habilidades técnicas importantes para a área de reprodução animal. A participação nas diferentes etapas do processo, desde as coletas a campo até o processamento laboratorial e a organização dos dados, ajudou a entender como cada parte do processo se relaciona e influenciam diretamente os resultados de produção.

O convívio e aprendizado com profissionais experientes, capacitados e muito dispostos a ensinar, bem como a observação da rotina de um laboratório comercial contribuíram para compreender melhor os desafios e as exigências do setor, tanto no aspecto técnico quanto no gerenciamento das atividades, fortalecendo os conhecimentos adquiridos ao longo da formação acadêmica.

II. Monografia

1. Introdução

A fertilização *in vitro* (FIV) é uma técnica de reprodução assistida que envolve a obtenção de oócitos imaturos, que são posteriormente maturados e fertilizados *in*

vitro. Em seguida, os zigotos resultantes são cultivados por aproximadamente 6 a 7 dias, até atingirem o estágio de blastocisto, momento em que podem ser transferidos para receptoras sincronizadas ou criopreservados, de acordo com sua qualidade (Sá Filho *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2024, p. 93; Watanabe, 2024, p. 383).

Essa biotecnologia desempenha papel fundamental na eficiência reprodutiva dos rebanhos, sendo amplamente utilizada na multiplicação de animais de alto valor genético, inclusive aqueles com patologias reprodutivas adquiridas. Além disso, a FIV é aplicada no melhoramento genético, em pesquisas científicas e na formação de bancos de germoplasma voltados à conservação de espécies (Sá Filho *et al.*, 2014).

Ao longo dos anos a *Produção de embriões in vitro* foi crescendo no mundo todo, superando a produção *in vivo* (figura 10). O Brasil é o segundo país com maior *Produção de embriões in vitro* no mundo, atrás apenas dos Estados Unidos (Viana, 2024), o que evidencia a importância da técnica para a reprodução dos rebanhos nacionais.

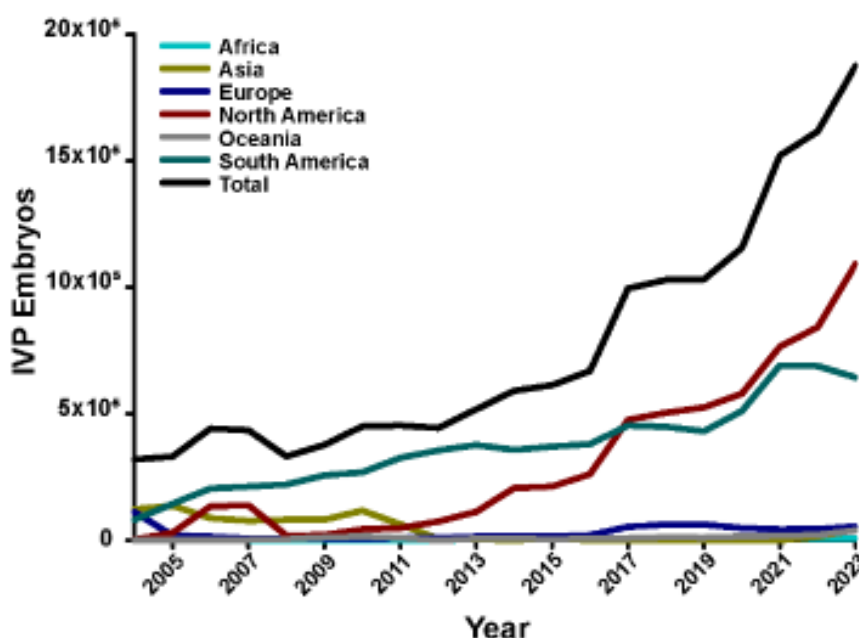


Figura 10. Gráfico mostrando a produção mundial anual de embriões bovinos *in vitro* por continente. **Fonte:** Viana, 2024.

O presente trabalho visa relatar o procedimento de aspiração folicular guiada por ultrassonografia e a produção *in vitro* de embriões de 38 doadoras da raça Nelore em uma agropecuária cliente da Vitrogen, mostrando e discutindo as taxas de produção de blastocisto e de prenhez após a transferência de embriões.

2. Revisão de literatura

2.1 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia

A aspiração transvaginal guiada por ultrassonografia ou OPU (*ovum pick-up*) é a técnica de eleição para a obtenção de oócitos para a *Produção de embriões in vitro* (PIVE) em bovinos (Sá Filho *et al.*, 2014), sendo considerada uma técnica menos invasiva quando comparada com a técnica de laparotomia, técnica que era utilizada há alguns anos (Bueno *et al.*, 2008; Luedke *et al.*, 2019). Os materiais necessários para a aspiração folicular são: agulha para aspiração, bomba de vácuo, transdutor acoplado a um guia de aspiração, rolhas, tubos de 50 mL circuito (Sá Filho *et al.*, 2014; Bueno *et al.*, 2008).

Para a realização do procedimento, a vaca doadora deve estar contida no tronco de contenção, e então realizada a higienização da vulva, períneo e cauda do animal com água e sabão, recebe anestesia epidural baixa utilizando de 2 a 4 mL de cloridrato de lidocaína, a depender do tamanho e temperamento do animal (Sá Filho *et al.*, 2014). Um transdutor acoplado a um guia é introduzido na vagina, guiando a agulha descartável para aspirar os folículos. A aspiração é realizada em um circuito fechado, onde a bomba de vácuo gera pressão negativa para sugar o líquido folicular e os complexos *cumulus-oócitos* que são depositados em tubos coletores de 50 mL acoplados ao sistema (Sá Filho *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2021).

Depois, os oócitos recuperados são analisados sob estereomicroscópio e classificados entre grau 1 e 4 (Silva *et al.*, 2021). Os oócitos de graus 1 a 3 são considerados viáveis, enquanto os de grau 4 apresentam menor capacidade de desenvolvimento, portanto sendo considerados inviáveis. Os oócitos de grau 1 apresentam mais de 3 camadas de células cumulus e citoplasma homogêneo, os de grau 2 apresentam entre 1 e 2 camadas de células do cumulus e citoplasma homogêneo ou levemente heterogêneo, os de grau 3 apresentam células do cumulus discretamente expandidas e o citoplasma irregular e os oócitos de grau 4 são desnudos, expandidos ou com citoplasma irregular (Gimenes, 2010; Sá Filho *et al.*, 2014), como mostra a figura 11.

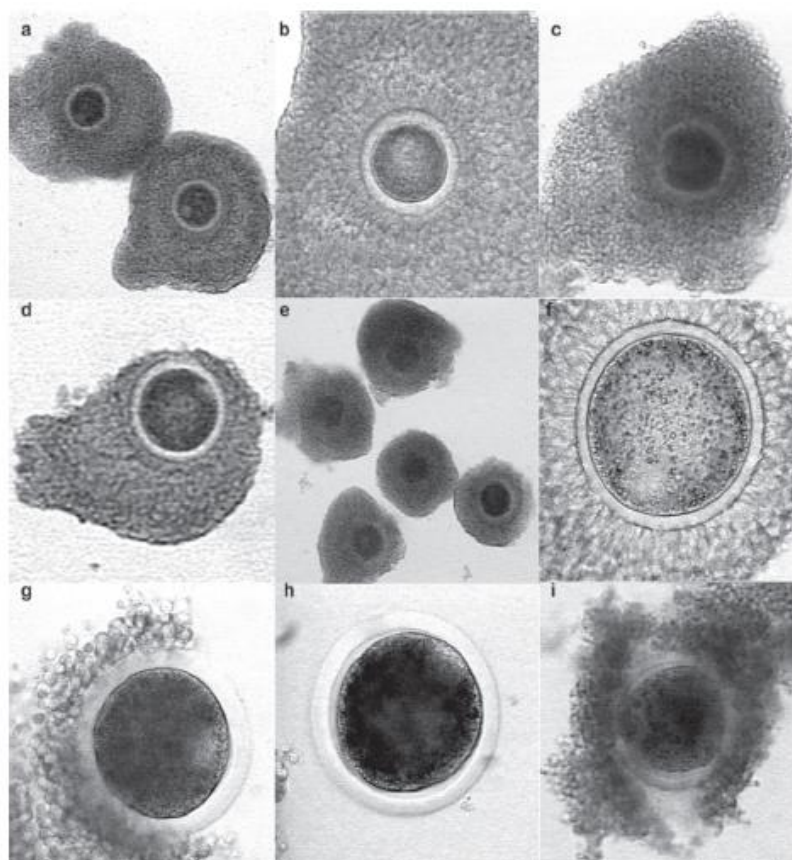


Figura 11. Classificação dos complexos cumulus-oócitos. Grau 1 (a, b, c, e), grau 2 (d,f), grau 3 (g) e grau 4 (h,i). **Fonte:** Sá Filho *et al.*, 2014.

2.2 Etapas da PIVE

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) começa com a obtenção dos oócitos que pode ser realizada a partir de doadoras vivas, por meio da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (OPU – *ovum pick-up*), ou pela punção de ovários provenientes de fêmeas de abatedouros, procedimento empregado principalmente para fins de pesquisa científica e controle de qualidade laboratorial (Sá Filho *et al.*, 2014; Mello *et al.*, 2016). Após a obtenção, realiza-se a maturação *in vitro*.

Durante a maturação, ocorre um conjunto de modificações citoplasmáticas e nucleares essenciais para que o oócito seja capaz ser fecundado e de sustentar o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto. Os oócitos imaturos encontram-se no estágio diplóteno da prófase I e, ao final da maturação, atingem a metáfase II (Sá Filho *et al.*, 2014; Mello *et al.*, 2016; Watanabe, 1993). Esse processo ocorre ao longo de aproximadamente 22 a 24 horas, sob condições controladas de temperatura e atmosfera (38,5 °C e 5% de CO₂ em umidade máxima), simulando o ambiente *in vivo* (Watanabe *et al.*, 2025, p. 93). Para a maturação, utilizam-se meios específicos, como Synthetic Oviductal Fluid (SOF), Ham's F-12 e Tissue Culture Medium 199 (TCM-199), geralmente suplementados com soro fetal bovino, aminoácidos, bicarbonato de sódio, FSH, LH, estradiol-17β, piruvato de sódio, lactato, vitaminas e antibióticos (Mello *et al.*, 2016), além de meios comerciais modernos (Watanabe *et al.*, 2025, p. 93).

A etapa subsequente é a fertilização *in vitro* (FIV), na qual os oócitos maturados são incubados com espermatozoides capacitados em meio de fecundação, possibilitando a combinação do material genético dos gametas e a formação do zigoto. Esse processo dura cerca de 18 a 20 horas (Sá Filho *et al.*, 2014; Watanabe, 2025, p. 93). A capacitação espermática, fundamental para que a fecundação ocorra (Watanabe, 2025, p. 93), envolve alterações no teor lipídico e na fluidez da membrana plasmática dos espermatozoides (Assumpção *et al.*, 2002; Watanabe, 2025, p. 93; Mello *et al.*, 2016). Os meios utilizados para induzir a reação acrossomal e promover a hipermotilidade incluem o TALP suplementado com BSA livre de ácidos graxos (6 mg/mL), piruvato (0,22 mg/mL), amicacina (75 µg/mL), heparina (30 µg/mL) e PHE (20 µM penicilamina, 10 µM hipotaurina e 1 µM epinefrina), além de meios comerciais disponíveis (Watanabe, 2025, p. 93; Watanabe, 1993). A seleção de espermatozoides viáveis pode ser realizada por gradiente de Percoll, por métodos comerciais como Select Sperm e Botupharma Animal Biotechnology, ou pelo método *swim-up* (Watanabe, 2025, p. 93; Sá Filho *et al.*, 2014).

Por fim, realiza-se o cultivo *in vitro* (CIV), cujo objetivo é fornecer condições ideais para que o zigoto realize as clivagens iniciais; ative o genoma embrionário, o que ocorre entre os estágios de 8 a 16 células em bovinos; compacte os blastômeros e inicie a diferenciação celular evidenciada pelo surgimento do blastocele, culminando no estágio de blastocisto (Watanabe, 2025, p. 93). A etapa CIV deve ser realizada em incubadora de CO₂ a 38,5 °C, com tensão de O₂ alta (5% CO₂ em ar atmosférico) ou baixa (6% CO₂, 5% O₂ e 89% N₂), com duração aproximada de 6 a 8 dias (Mello *et al.*, 2016). Utilizam-se meios comerciais ou o Synthetic Oviduct Fluid (SOF) suplementado com piruvato, amicacina, soro fetal bovino e BSA (Watanabe, 2025, p. 93).

No terceiro dia de cultivo, é avaliado a taxa de clivagem dos zigotos. No sétimo dia de cultivo, é realizada a avaliação da formação de blastocistos e a classificação desses quanto a estágio de desenvolvimento (inicial, blastocisto, expandido, em eclosão e eclodido) e à qualidade do embrião que varia de morto ou degenerado à excelente. Essas classificações são indispensáveis para selecionar os embriões aptos para a transferência (TE) ou criopreservação (Sá Filho *et al.*, 2014).

2.3 Classificação dos embriões

A mórula é caracterizada por uma massa de células com evidente divisão entre os blastômeros, ocupando o espaço vitelino quase por completo, o blastocisto inicial é caracterizado pela formação do blastocele e início da diferenciação entre trofoblasto e botão embrionário. Já o blastocisto expandido, se caracteriza pela expansão do embrião e redução da zona pelúcida. O blastocisto em eclosão se encontra parcialmente livre da zona pelúcida e ao fim da eclosão (blastocisto eclodido), este embrião estará totalmente livre (Batistela *et al.*, 2023).

Segundo a IETS, a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões, a classificação da qualidade dos embriões usa códigos que vão de 1 (embriões de qualidade excelente ou boa) até 4 (embriões mortos ou degenerados), como demonstrado na figura (Viena, 2009).

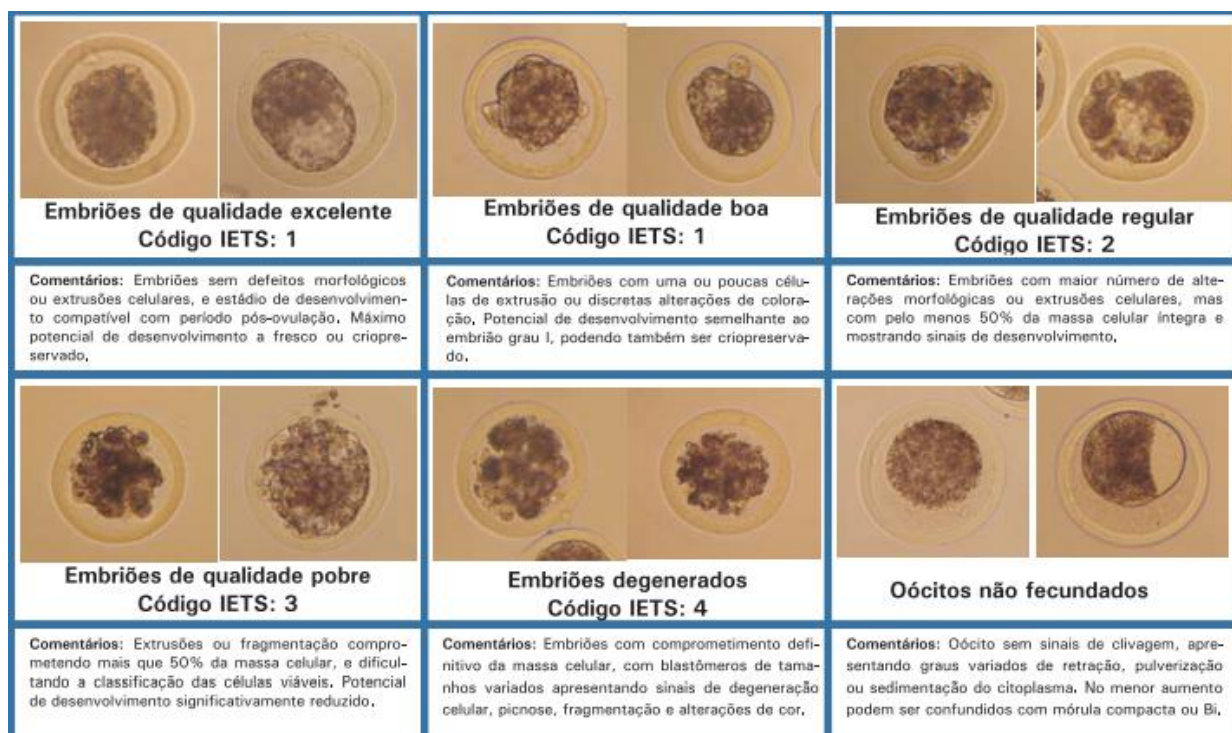


Figura 12. Classificação da qualidade dos embriões bovinos segundo a IETS. **Fonte:** Viana, 2009.

2.4 Transferência de embriões a fresco

A transferência de embriões é uma técnica que tem o objetivo de acelerar o melhoramento genético dos animais ao reduzir o intervalo de gerações (Andrade *et al.*, 2002). Essa técnica proporciona maior aproveitamento genético de uma fêmea doadora com qualidade genética superior, pois permite a produção de vários embriões e nascimento de descendentes por ano sem que a fêmea passe pelo processo de gestação (Santos *et al.*, 2012). Ademais, permite a utilização de animais com alterações reprodutivas adquiridas, impedindo o descarte dos mesmos (Honorato *et al.*, 2013).

Apesar de ser uma técnica vantajosa e amplamente utilizada, o sucesso da transferência de embriões depende da seleção e manejo corretos das receptoras, visto que são as responsáveis por gestar e alimentar o bezerro desde seu nascimento ao desmame (Seidel e Seidel, 2005; Dantas *et al.*, 2018). Deve ser realizado exame clínico geral e específico do aparelho reprodutor das receptoras, sendo imprescindível a presença de um corpo lúteo no momento da transferência do embrião, dado a necessidade de concentrações elevadas de progesterona plasmática para a manutenção da gestação (Filho *et al.*, 2013).

Para a realização da inovulação transcervical dos embriões, ou seja a deposição dos embriões no útero da fêmea receptora (Rumpf *et al.*, 2003), deve-se conter a fêmea em tronco de contenção, realizar a higienização da vulva e a anestesia epidural e através da ultrassonografia, encontrar em qual ovário o corpo lúteo está presente (Spell *et al.*, 2001). Apenas embriões classificados entre os graus 1 e 3 são indicados para a transferência, devendo ser previamente envasados em palhetas

contendo meio de cultivo. O envase deve ser feito de modo que o embrião ficará em uma coluna no centro da palheta, separado das colunas das extremidades por uma coluna de ar. As palhetas devem ser devidamente identificadas, a fim de evitar equívocos no momento da inovulação (Gonçalves et al., 2008).

A palheta contendo o embrião é acoplada ao inovulador, protegida por bainha estéril e camisinha sanitária, com o objetivo de prevenir a contaminação uterina. O inovulador é introduzido pela vagina e guiado através da cérvix com auxílio da manipulação retal até corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, onde o embrião é depositado, preferencialmente no terço final próximo à junção útero-tubárica (Hafez e Hafez, 2004).

2.5 Criopreservação

A criopreservação dos embriões é uma biotécnica importante para a logística da *Produção de embriões in vitro* e transferência de embriões. Além de facilitar a comercialização (Sá Filho et al., 2014).

São duas principais técnicas de criopreservação utilizados: o congelamento DT (direct transfer) ou congelamento lento e a vitrificação. O primeiro visa o congelamento do meio externo ao embrião, promovendo desidratação gradual do blastocisto até que o mesmo atinja a temperatura de vitrificação da matriz intracelular (Sá Filho et al., 2014). Os blastocistos são expostos a crioprotetores e envasados em palhetas que serão colocadas a temperaturas em torno de -5 e -7°C, em seguida é realizado o seeding, que tem como objetivo a congelação extracelular para então a temperatura ser gradativamente reduzida (0,5°C por minuto) para temperaturas entre -30°C e -65°C, quando podem ser imersas no nitrogênio líquido (Sá Filho et al., 2014; Vajta e Nagy, 2006).

A vitrificação, ou congelação rápida, tem como objetivo induzir a diminuição abrupta da temperatura do embrião, transpondo a etapa de cristalização. O embrião é desidratado ao ser colocado em soluções osmóticas e tem rápido contato com os crioprotetores antes de ser submetido à baixas temperaturas (Sá Filho et al., 2014; Vajta, 2000).

3. Relato de caso

No dia 12 de setembro de 2025, foi realizada a aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU) de 38 vacas da raça Nelore em uma fazenda cliente da Vitrogen. As doadoras foram divididas em dois grupos: o primeiro, composto por 15 vacas, teve o procedimento iniciado às 8h11 e finalizado às 12h46; o segundo grupo, com 23 vacas, foi aspirado entre 14h46 e 20h40.

A etapa inicial consistiu na organização dos equipamentos necessários para a OPU, incluindo agulha de aspiração, bomba de vácuo, transdutor acoplado ao guia de aspiração, tubos Falcon de 50 mL, luvas de palpação, agulhas, lidocaína para anestesia epidural e o aparelho de ultrassom. Paralelamente, o médico-veterinário responsável pela seleção dos oócitos realizou o preparo do laboratório de campo.

Higienização completa da bancada com álcool 70% e em seguida a montagem do campo de trabalho, forrando com papel (figura 12). Os materiais foram organizados: higienização e acionamento da placa aquecedora, onde foram colocadas racks para depositar e aquecer os tubos com meio de seleção ou lavagem. Seguiu-se com a montagem da lupa, organização das ponteiras, pipetadores, placas de 60mm, preparo e aquecimento do PBS, no qual foi adicionado 1 mL de heparina (1:1), montagem dos microtubos, nos quais foi colocado 500 μ L de meio MIV cobertos por 300 μ L de óleo mineral, ambos produzidos pela Vitrogen, e posteriormente colocados na Labmix para estabilização de pH e aquecimento. Por fim foi feita a preparação dos tubos utilizados para coleta e lavagem: Falcons com 5 mL de PBS heparinizado, para onde o fluido seria aspirado, e tubos adicionais com 50 mL da mesma solução para a limpeza do circuito entre uma vaca e outra.

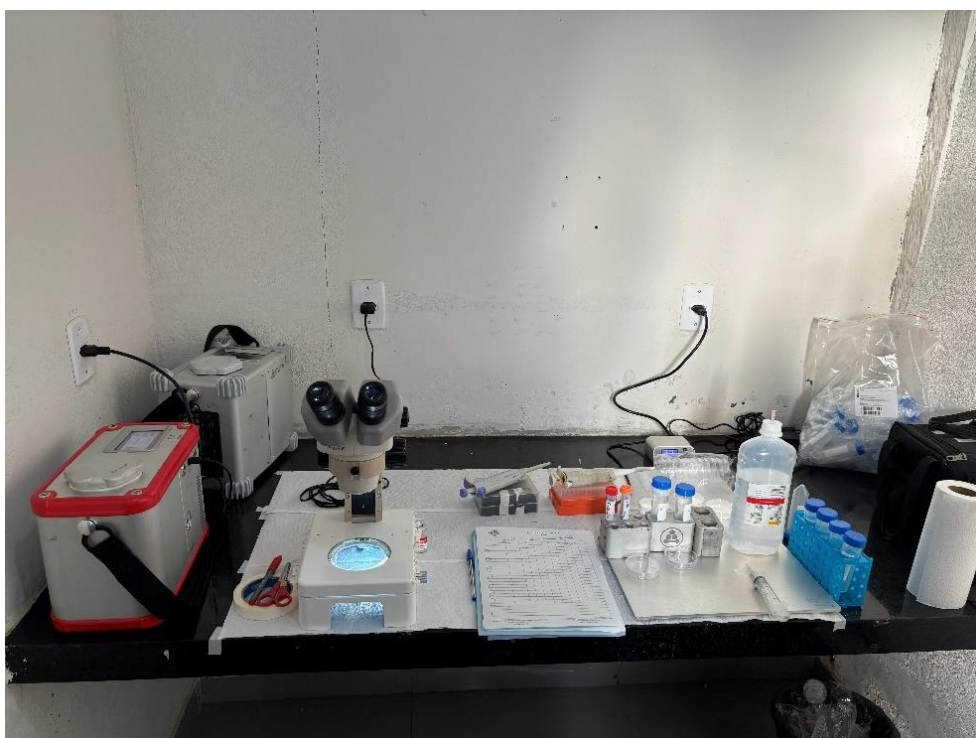


Figura 13. Bancada organizada com lupa, Labmix, mesa aquecedora, pipetadores, ponteiras, placas de petri, tubos, PBS e protocolo de OPU. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

Para iniciar o procedimento, as doadoras eram conduzidas ao tronco de contenção, onde passavam pela higienização da vulva, períneo e cauda. Em seguida, recebiam anestesia epidural com 2 mL de cloridrato de lidocaína, e então era iniciada a aspiração folicular. Para isso, o guia acoplado à agulha era introduzido na vagina da vaca, permitindo a visualização e punção dos folículos guiada por ultrassonografia (figura 13).

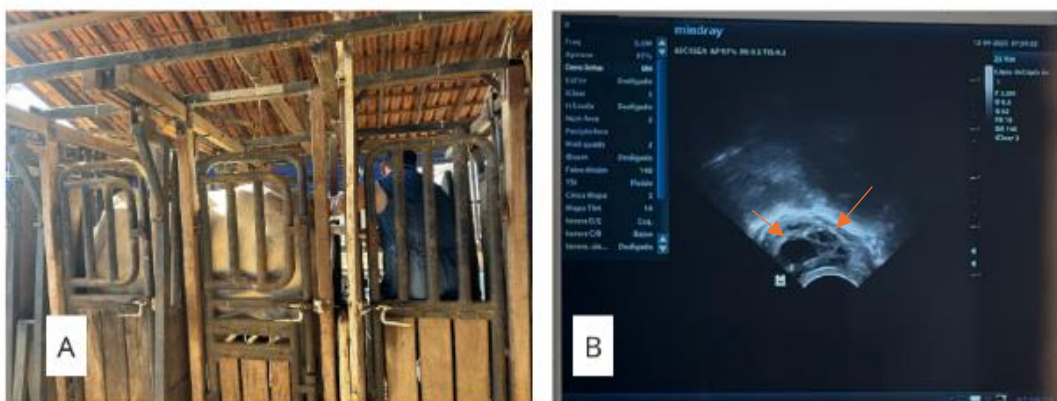


Figura 14. A: OPU sendo realizada por médico veterinário. **B:** imagem ultrassonográfica mostrando ovário com folículos de diferentes tamanhos (setas). **Fonte:** Arquivo pessoal.

O fluido folicular contendo os oócitos aspirados era imediatamente enviado ao laboratório de campo, onde realizou-se a filtragem dos oócitos, e o conteúdo retido no filtro era transferido para uma placa de Petri de 60 mm ao lavar o minifiltro utilizando PBS aplicado com auxílio de seringa e agulha e, em seguida, iniciava-se a busca dos oócitos (figura 14). Após localizar todos os oócitos, estes eram transferidos para uma gota de 100 μ L de meio de seleção, produzido pela Vitrogen, onde se realizou a classificação e seleção dos oócitos. Os oócitos viáveis eram colocados para maturação, passando previamente por duas gotas adicionais de meio de seleção para lavagem. Os oócitos selecionados eram então depositados no microtubo contendo o meio de maturação, sendo realizada a troca manual de gás. Esse procedimento foi repetido para todas as vacas aspiradas.



Figura 15. A: Filtragem do líquido folicular aspirado. **B:** Médico veterinário realizando a busca de oócitos. **Fonte:** Arquivo pessoal.

A cada doadora, registraram-se no protocolo de OPU a identificação do animal, o número de óocitos totais, os viáveis e a quantidade destinada ao meio de maturação, permitindo controle preciso da produção. Ao final da etapa, também foram acrescentados os nomes dos touros utilizados nos acasalamentos correspondentes a cada doadora. O primeiro grupo, de 15 doadoras, apresentou um total de 383 óocitos viáveis aspirados, enquanto no segundo foram aspirados 598 óocitos viáveis.

Os óocitos em processo de maturação foram enviados ao laboratório, onde foi preenchido um protocolo de produção *in vitro*, no qual todos os procedimentos realizados ao longo da produção são registrados, permitindo o acompanhamento e controle das etapas. No protocolo também é feita a anotação da distribuição dos óocitos de cada doadora entre as gotas e placas utilizadas.

Após 24 horas, foi realizada a fecundação *in vitro* (FIV). Para essa etapa, foram utilizados cinco touros para o primeiro grupo aspirado e cinco para o segundo grupo. As placas de FIV referentes à primeira OPU foram montadas na tarde anterior (dia 12 de setembro), permitindo a estabilização do meio até a manhã seguinte. Para a segunda OPU, a montagem das placas ocorreu no período da manhã (13 de setembro), com o procedimento sendo executado à tarde. O meio utilizado foi produzido pela Vitogen.

A montagem das placas consistiu na preparação do meio de FIV com a adição das alíquotas H e PHE, marcação da posição da gota 1 e formação de sete gotas de 35 μL , posteriormente cobertas por 3.500 μL de óleo mineral. Após a cobertura, cada gota recebeu mais 35 μL de meio para completar o volume final de 70 μL .

Antes da realização da fecundação, realizou-se a preparação do gradiente de Percoll. Para isso, preparou-se a solução a 45%, homogeneizando 200 μL de Sperm, meio de diluição do Percoll produzido pela Vitrogen, com 200 μL de Percoll, enquanto no fundo do microtubo foram adicionados 400 μL de Percoll a 90%, formando o gradiente. Esse material foi mantido em aquecimento até o momento do uso. Após montar o gradiente de Percoll, foi feita a lavagem dos óocitos maturados para retirada do meio de maturação em duas a três gotas de 70 μL do meio FIV em placa Petri. Os óocitos foram então lavados nessas gotas e transferidos para as placas de FIV estabilizadas.

As palhetas de sêmen dos touros utilizados foram retiradas do botijão de nitrogênio e descongeladas a 37 °C por 30 segundos, utilizando o descongelador. Após o descongelamento, o sêmen foi depositado no eppendorf contendo o gradiente de Percoll e centrifugado, por ter sido utilizado sêmen convencional, a primeira rotação da centrífuga foi de 4700 rpm por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentado meio FIV, realizando nova centrifugação de 1000 rpm por 3 minutos. O novo pellet foi recuperado e utilizado para a fecundação.

Com os espermatozoides selecionados, a placa contendo os óocitos foi retirada da incubadora e o sêmen depositado nas gotas de FIV. Foram avaliadas concentração espermática, motilidade e vigor, repassando as gotas para assegurar que em todas havia sido adicionado o sêmen. Ao final, as placas de FIV foram retornadas à

incubadora EVE, em baixa tensão de O₂ e com pressão igual a 50 mmHg, onde permaneceram por 22 horas.

As placas de cultivo foram montadas na tarde do dia 13 de setembro para que ficassem estabilizando na incubadora *overnight*, utilizando o meio de cultivo produzido pela Vitrogen. Para a preparação, foram realizadas gotas de 45 µL de meio CIV, as quais foram cobertas com 3.600 µL de óleo mineral e, em seguida, completadas com mais 45 µL do mesmo meio. Para realização do CIV, os zigotos que estavam na placa de FIV foram lavados em 4 gotas de 70 µL de meio CIV. Na primeira gota, realizou-se a remoção das células do cumulus por turbilhonamento, utilizando o pipetador na metade do volume da gota. Nas gotas seguintes, os zigotos foram apenas lavados antes de serem transferidos para a placa de cultivo. O cultivo foi realizado na incubadora EVE, com baixa tensão de O₂ e pressão 15 mmHg.

No dia 3 de cultivo, no período da tarde, foi realizada a contagem das estruturas clivadas, o desprendimento dos embriões aderidos ao fundo das placas e o *feeding*, que consistiu na retirada de 50% de meio da gota e reposição do mesmo volume com meio CIV novo, previamente aquecido e estabilizado na incubadora por, no mínimo, duas horas. No dia 5, o procedimento de *feeding* foi repetido. Já no dia 6 de cultivo, foi realizada a previsão de quantos blastocistos poderiam se formar para o dia 7 de cultivo. Os embriões do segundo grupo de OPU (23 vacas), foram transferidos para microtubos contendo meio CIV e colocados em uma Labmix para serem transportados até a fazenda onde seriam envasados em palhetas e transferidos para as receptoras sincronizadas e com corpo lúteo presente.

Na produção do primeiro grupo de OPU, de 383 oócitos viáveis foram obtidos 222 embriões (57,9%), dos quais 185 foram vitrificados entre o sétimo dia de cultivo e a manhã do oitavo dia. Os 37 embriões restantes foram descartados por apresentarem qualidade inadequada para vitrificação ou por estarem em estágio de desenvolvimento atrasado (blastocistos correspondentes a D9 e D10).

Para a realização da vitrificação, foram preparadas gotas de 50 µL de meio de lavagem previamente aquecido, além de duas gotas de 50 µL do meio de vitrificação V1 e duas gotas do meio V2, ambos mantidos à temperatura ambiente. Os embriões foram retirados da placa de CIV e transferidos para a gota de meio de lavagem. Em seguida, passaram por uma primeira gota de V1 para remoção completa do meio de lavagem; nesse momento, foi acionado um temporizador para controlar o tempo de permanência dos embriões em cada gota. Posteriormente, foram posicionados na segunda gota de V1, onde permaneceram até completar oito minutos. Após esse período, os embriões foram lavados em uma gota de V2 e transferidos para a segunda gota de V2. Em até um minuto, os embriões foram colocados nas palhetas de vitrificação e imediatamente imersos em nitrogênio líquido (-196°C). Por fim, as palhetas foram organizadas em racks identificadas e armazenadas em botijão de nitrogênio líquido.

No segundo grupo, de 598 oócitos viáveis foram produzidos 168 (28%) embriões, sendo 166 transferidos a fresco para receptoras previamente sincronizadas. Apenas 2 embriões foram descartados devido à ausência de receptoras disponíveis.

Após 30 dias, o médico veterinário retornou à fazenda para a realização do diagnóstico de gestação, resultando em uma taxa de prenhez de 47,2%.

4. Discussão

A associação entre OPU e PIVE é um importante instrumento para impulsionar o melhoramento genético (Watanabe *et al.*, 2017). O caso descrito, envolvendo a OPU de 38 doadoras da raça nelore, demonstra a agilidade do processo da produção *in vitro* de embriões, na qual consegue-se mais de um descendente de uma mesma vaca. A divisão das doadoras em dois grupos (manhã e tarde), pela grande quantidade de vacas aspiradas, influenciou diretamente a logística de produção, em especial da etapa FIV, que também precisou ser realizada em duas etapas, visto que a maturação dos oócitos *in vitro* deve ocorrer entre 22 e 24 horas para o sucesso da técnica.

No primeiro grupo, foram recuperados 383 oócitos viáveis que resultaram em 222 embriões (57,9%), sendo que 185 foram vitrificados. A elevada proporção de embriões aptos à criopreservação sugere boa eficiência das etapas de maturação, fecundação e cultivo, demonstrando que o ambiente laboratorial estava adequado em termos de temperatura, pH e qualidade dos meios (Lane *et al.*, 2008). Para o segundo grupo, foram recuperados 598 oócitos viáveis, resultando em 168 embriões produzidos (28%), 166 embriões transferidos e taxa de prenhez de 47,2%. Em condições comerciais são relatadas taxas de embriões entre 26 e 35% para raça nelore (Pontes *et al.*, 2011; Watanabe *et al.*, 2017), de modo que ambos os grupos apresentam taxas de produção dentro do esperado pela literatura.

A diferença entre as taxas de produção de embriões entre os grupos pode ocorrer por fatores como a competência dos oócitos aspirados em se desenvolver a blastocistos, visto que oócitos incompetentes não conseguem ativar o genoma embrionário, sendo bloqueados na transição materno-zigótica, que ocorre no estágio de 8 células nos bovinos (Sirard *et al.*, 2006; Gimenes, 2010). O diâmetro dos oócitos é um fator diretamente relacionado à competência oocitária, uma vez que a ativação nuclear, em bovinos, só é possível em estruturas a partir de 110 μ m (Gimenes, 2010) e o mesmo foi observado quanto ao diâmetro do folículo, alguns autores demonstraram que oócitos provenientes de folículos menores que 2 mm são menos competentes quando comparados aos de diâmetro superior (Tan; Lu, 1990; Pavlok *et al.*, 1992).

Outro fator que pode afetar a taxa de blastocistos é a variação entre touros, sendo a fertilidade desses variável tanto a campo quanto na produção *in vitro* (Watanabe *et al.*, 1995). Watanabe *et al* obtiveram variações nas taxas de blastocistos entre 16 e 50% utilizando 50 reprodutores da raça Nelore. A interação entre a doadora e o touro também é um fator determinante na produção de embriões, Dayan *et al* (2000) observaram que um mesmo touro apresentou variação na produção de embriões e nas taxas de prenhez quando acasalado com diferentes doadoras. Ademais, o fato do envase ter ocorrido a campo, sendo selecionados apenas os de melhor qualidade no dia 7 de cultivo e de acordo com a quantidade de receptoras disponíveis, pode esconder a real taxa de produção.

A literatura descreve que embriões Nelore produzidos *in vitro* apresentam taxas de prenhez variando entre 33% e 45% (Pontes *et al.*, 2011; Jaguszeski *et al.*, 2019). No caso descrito, o diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a transferência dos embriões, resultando em uma taxa de prenhez de 47,2%, valor ligeiramente superior ao relatado na maioria dos estudos. Pontes *et al.* (2011) observaram taxas de prenhez de 36,57% aos 30 dias e 33,12% aos 60 dias, enquanto um estudo anterior dos mesmos autores (Pontes *et al.*, 2009) reportou 45,6% aos 30 dias e 41,5% aos 60 dias. No momento da elaboração deste relato, a confirmação do diagnóstico aos 60 dias ainda não havia sido realizada, impossibilitando a comparação direta com os valores de prenhez tardia descritos na literatura.

5. Conclusão

A associação entre OPU e PIVE demonstrou ser uma estratégia eficiente para acelerar o melhoramento genético de bovinos da raça, permitindo elevada recuperação de oócitos e produção expressiva de embriões. No caso descrito, a divisão das doadoras em dois grupos evidenciou a necessidade de organização logística, especialmente no respeito ao tempo de maturação oocitária, destacando a importância do planejamento operacional para manter a eficiência do processo.

As taxas de produção de embriões obtidas em ambos os grupos permaneceram dentro do esperado para a raça, refletindo condições laboratoriais adequadas e o bom desempenho das etapas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. A diferença entre os grupos pode ser atribuída a fatores biológicos, como competência oocitária e variação entre touros, além da interação específica entre doadora e reprodutor, aspectos amplamente reconhecidos como determinantes na resposta produtiva.

A taxa de prenhez observada reforça a qualidade dos embriões produzidos, ainda assim, ressalta-se que a ausência do diagnóstico aos 60 dias impede comparações completas com estudos que avaliam taxas de prenhez.

De modo geral, os resultados obtidos confirmam o potencial da OPU associada à PIVE como ferramenta robusta para intensificar o ganho genético, desde que acompanhada de adequado manejo reprodutivo, controle laboratorial rigoroso e escolha criteriosa de doadoras e reprodutores.

6. Referências bibliográficas.

- ANDRADE, J. C. O. *et al.* Use of steroid hormone treatments prior to superovulation in Nelore donors. ***Animal Reproduction Science***, v. 69, n. 1-2, p. 9-14, 2002.
- ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. *et al.* Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. ***Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science***, v. 39, p. 149-156, 2002.
- BATISTELA, M. V. V.; PEREIRA, J. L. S. A.; NASCIMENTO, V. A.; DIAS, M. Produção *in vitro* de embriões e novas estratégias na produção de oócitos em bovinos. ***Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer***, Jandaia-GO, v.20 n.46; p. 205, 2023.
- BUENO, A. P. *et al.* Produção *in vitro* de embriões bovinos. ***Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária***, Garça, ano IV, n. 11, jul. 2008.
- DANTAS, K. S. A. *et al.* Seleção de receptoras em um programa de transferência de embriões (PIVE) em bovinos no Nordeste do Brasil. ***Ciência Animal***, v. 28, n. 1, 2018.
- DAYAN, A.; WATANABE, M. R.; WATANABE, Y. F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. ***Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS***, v. 28, n. 1, p. 181-185, 2000.
- FILHO, L. C. C. *et al.* Fatores que interferem na eficiência reprodutiva de receptoras de embrião bovino. ***Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR***, v. 16, n. 2, p. 201-208, 2013.
- GIMENES, L.U. **Taxa de recuperação *in vivo* e competência *in vitro* de oócitos bubalinos, zebuínos e taurinos aspirados em diferentes fases da onda de crescimento folicular.** 2010. 122f. Dissertação (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FREITAS, V. J. F. ***Biotécnicas: Aplicadas à Reprodução Animal***. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 395
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Micromanipulação de Gametas e Embriões: Fertilização In Vitro e Transferência de Embriões (FIV/TE). In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. ***Reprodução Animal***. 7ª ed. São Paulo: Manole, p. 447 - 470, 2004.
- HONORATO, M. T. *et al.* Importância da escolha de receptoras em um programa de transferência de embriões em bovinos. ***PUBVET***, v. 7, n. 19, 2013.
- JAGUSZESKI, M. Z. *et al.* Pregnancy rate of recipient cows after transfer of *in vitro*-produced Nelore embryos. ***Revista Caatinga***, Mossoró, v. 32, n. 4, p. 1087-1091, out./dez. 2019.
- LANE, M. *et al.* To QC or not to QC: the key to a consistent laboratory? ***Reproduction, Fertility and Development***, v. 20, p. 23–32, 2008.

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

MELLO, 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, abr./jun. 2016.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, p. 63-67, 1992.

PONTES, J. H. F. *et al.* Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, p. 690-697, 2009.

PONTES, J. H. F. *et al.* 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.

RUMPF, R.; BEM, D. E.; PEIXER, M. A. S.; SOUZA, R. V. Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e equina. Brasília: **EMBRAPA – Recursos genéticos e biotecnologia**, 2000.p.71-103.

SPELL, A. R.; BEAL, W. E.; CORAH, L. R.; LAMB, G. C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 287-297, 2001

SÁ FILHO, M. F.; PENTEADO, L. A.; MENDANHA, M. F.; SANTOS, F. A.; BARUSELLI, P. S. Superovulação e produção *in vitro* de embriões em bovinos. **Embrapa Gado de Leite**, Juiz de Fora, MG, 2014. 28 p. (Documentos, 178).

SANTOS, K. J. G. *et al.* Biotecnologias reprodutivas e fisiologia reprodutiva da fêmea bovina: conhecimento para o sucesso. **PUBVET**, v. 6, n. 36, 2012.

SEIDEL, G. E. J.; SEIDEL, S. M. *Training manual for embryo transfer in cattle*. Fort Collins: **FAO Animal Production and Health Paper**, 2005.

SILVA, A. E. *et al.* Aspiração folicular em bovinos – revisão. **Revista Sinapse Múltipla**, v. 10, n.1, p.28-30, jan/jul.2021.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, p. 126-136, 2006.

TAN, S. J.; LU, K. H. Effects of different estrous stages of ovaries and sizes of follicles on generation of bovine embryos *in vitro*. **Theriogenology**, v. 33, p. 335, 1990.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 357-364, 2000.

VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 12, p. 779-796, 2006.

VIANA, J.H.M. Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo. **Embrapa Gado de Leite. Comunicado Técnico**, 59. 4p. 2009.

VIANA, J. H. M. 2023 *Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals*. **Embryo Technology Newsletter**, v. 42, n. 4, 2024. International Embryo Technology Society (IETS).

WATANABE, Y. F. **Desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos após maturação e fecundação *in vitro* com sêmen de *Bos taurus* e *Bos indicus***. 1993. 131 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1993.

WATANABE, Y. F. *et al.* A fecundação *in vitro* como critério de seleção para fertilidade em tourinhos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, p. 236, 1995.

WATANABE, Y. F. *et al.* Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with *in vitro* embryo production and field fertility following embryo transfer. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 635-644, 2017.

WATANABE, Y. F. Evolução da FIV em bovinos no Brasil. In: ALVARENGA, R. de L. L. S; DINIZ, P; COHEN, C. N. **30 anos de embriologia no Brasil**. 1. Ed. Curitiba, PR: Ás Editorial, 2024. p. 383-402.

WATANABE, *et al.* Produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil. In: NOGUEIRA, M. F. G e SENEDA, M. M. (Org.). **Reprodução assistida em animais domésticos: Histórico, protocolos e estado da arte no Brasil e no mundo**. 1. ed. São Paulo: Editora Unesp, 2025. p. 93-116.