

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

Relatório Final do Estágio Curricular em Prática Veterinária, realizado junto à Embriovita Reprodução Animal, Embryoplus Brasil e Lagoa da Serra LTDA.

Assunto de interesse: Produção *in vitro* de embriões bovinos.

Julia Consolim Franhani

**Jaboticabal/SP
2021**

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

Relatório Final do Estágio Curricular em Prática Veterinária,
realizado junto à Embriovita Reprodução Animal, Embryoplus
Brasil e Lagoa da Serra LTDA.

Assunto de interesse: Produção *in vitro* de embriões bovinos

Julia Consolim Franhani

Orientadora: Profa. Lindsay Unno Gimenes

Trabalho apresentado à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP,
Câmpus de Jaboticabal, para graduação
em MEDICINA VETERINÁRIA

Jaboticabal/SP
2/2021

F827r Franhani, Julia Consolim
Relatório Final do Estágio Curricular em Prática Veterinária,
realizado junto à Embriovita Reprodução Animal, Embryoplus Brasil
e Lagoa da Serra LTDA. Assunto de interesse: Produção in vitro de
embriões bovinos. / Julia Consolim Franhani. -- Jaboticabal, 2021
56 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Medicina
Veterinária) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Lindsay Unno Gimenes

1. Bovinos. 2. Transferência de Embriões. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



CERTIFICADO

Certifico que o Relatório de Estágio Curricular em Prática Veterinária foi apresentado à Banca Examinadora e aprovado, conforme especificações abaixo

TÍTULO: Relatório Final do Estágio Curricular em Prática Veterinária, realizado junto à Embriovita Reprodução Animal, Embryoplus Brasil e Lagoa da Serra LTDA.

Assunto de interesse: Produção *in vitro* de embriões bovinos

ACADÊMICA: Julia Consolim Franhani

CURSO: Medicina Veterinária

ORIENTADOR: Lindsay Unno Gimenes

SUPERVISORES: Felipe Benedetti Justus, Matheus Castro, Leonardo Maia

LOCAIS: Embriovita Reprodução Animal, Embryoplus Brasil, Lagoa da Serra LTDA

11ª Semestre: 1 Ano: 2021

Jaboticabal, 6 de Agosto de 2021

BANCA EXAMINADORA

Presidente Profª. Drª. Lindsay Unno Gimenes

Membro Msc. Letcia Fiori

Membro Dr. Guilherme Rossi

Three horizontal lines with handwritten signatures above them. The first signature is in black ink, the second is in black ink, and the third is in blue ink.

Karina Paes Birger

Profª. Dra.

- Coordenadora da CEGRA -

Dedico esse trabalho aos meus pais, que se doaram ao máximo e me deram forças para seguir meus sonhos e trilhar meu caminho.

Agradecimentos

Aos meus pais, Estefânia e Daniel, por permitirem que eu fosse atrás dos meus sonhos e acreditarem em mim. Obrigada por tudo, sem vocês nada disso seria possível. Obrigada à minha família, que sempre torceu por minhas vitórias, principalmente meus avós, José, Maria Lúcia, Carlos e Erci.

À República BoaZona, por ter me proporcionado tantas alegrias e a certeza de que sempre terei para onde retornar Da-Gaita, Vistosa, Iludida, Recruta, Bússola, Polenguinha, Ismir, Bah-Guria, Pussy-Power, Apalusa, SóVai, Bã-fi, Nazaré, Catupily, Coxêra, Batina, Escape, Fuzuê, Menstru, Zina e Cardume obrigada por todo amor, carinho e todas as broncas, com certeza vocês me fizeram crescer. Às minhas veteranas, espero que eu seja exemplo para as minhas bixetes assim como vocês foram para mim.

Obrigada às minhas amigas, que estenderam a mão para mim, desde o primeiro dia que estive em Jaboticabal, Passa-mal, Totévênu, Cigana e Tchica. Às amigas, que ao decorrer dos anos se tornaram indispensáveis no meu dia-a-dia, Favorável, Cria, Nu-xão e Xiubaca. Vocês foram fundamentais para que os desafios que enfrentamos fossem mais leves e divertidos.

Ao Felipe (Bafo), meu namorado, obrigada, por todos esses anos de amor e carinho, por sempre me colocar em primeiro lugar quando precisei, por nunca ter me deixado nos momentos difíceis e estar presente nos de alegria.

Muito obrigada à Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes, por ter aceitado ser minha orientadora e por todo conhecimento agregado. Obrigada ao Prof. Dr. Américo Garcia da Silva Sobrinho, meu orientador de iniciação científica, pela oportunidade de crescimento acadêmico e pessoal.

E, por fim, agradeço à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, *Campus* de Jaboticabal, por ter me proporcionado os melhores anos da minha vida. Foi em Jaboticabal onde vivi grandes experiências, que nem de longe iria imaginar, que me fizeram crescer tanto pessoalmente quanto profissionalmente, tudo que passei nesses 5 anos foram essenciais para me tornar quem sou hoje.

ÍNDICE

I.	Relatório de Estágio Curricular Obrigatório.....	9
1.	Introdução	9
2.	Descrição dos Locais de Estágio	10
2.1.	Embriovita Reprodução Animal.....	10
2.2.	Embryoplus Brasil	10
2.3.	Lagoa da Serra LTDA/ CRV Brasil.....	11
3.	Descrição das Atividades de Estágio	12
3.1.	Embriovita Reprodução Animal.....	12
3.2.	Embryoplus	14
3.3.	Lagoa da Serra LTDA/ CRV Brasil.....	17
4.	Discussão das atividades desenvolvidas	18
4.1.	Embriovita Reprodução Animal.....	18
4.2.	Embryoplus	18
4.3.	Lagoa da Serra LTDA/ CRV Brasil.....	19
5.	Conclusão	21
II.	Assunto de interesse: Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	22
	Resumo.....	22
	Abstract.....	23
1.	Introdução	24
2.	Revisão de Literatura	25
2.1.	Vantagens da utilização da produção <i>in vitro</i> de embriões	25
2.2.	Etapas da PIVE.....	26
2.2.1.	Aspiração Folicular Guiada por Ultrassom.....	28
2.2.2.	Seleção de Oócitos	29
2.2.3.	Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	32
2.2.4.	Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	34
2.2.4.1.	Métodos de preparação espermática para FIV	34
	Capacitação espermática.....	36
2.2.4.2.	Fecundação <i>in vitro</i>	36
2.2.5.	Cultivo embrionário <i>in vitro</i> (CIV)	39
2.2.5.1.	Clivagem	40

2.2.6.	Envase e criopreservação dos embriões	42
3.	Relato de caso	44
4.	Discussão	47
5.	Considerações Finais.....	49
	Referências Bibliográficas.....	50

I. Relatório de Estágio Curricular Obrigatório

1. Introdução

O presente relatório tem como objetivo descrever e discutir as atividades realizadas pela discente Julia Consolim Franhani, durante o período de Estágio Curricular Obrigatório, o qual é necessário para a conclusão do curso de Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – UNESP, campus de Jaboticabal.

O estágio foi realizado em três períodos, o primeiro, de 12 de outubro a 12 de dezembro de 2020, na Embriovita Reprodução Animal, localizada na cidade de Uberlândia – MG, sob supervisão do Médico Veterinário Felipe Benedetti Justo, o segundo de 01 de março a 10 de abril de 2021, na Embryoplus, localizada em Monte Mor – SP, sob supervisão do Médico Veterinário Matheus de Oliveira Souza Castro, e, por fim, de 03 de maio a 30 de junho, o estágio foi realizado na Lagoa da Serra LTDA, em Sertãozinho – SP, sob supervisão do Médico Veterinário Leonardo Maia.

O propósito do estágio curricular é o aprimoramento, tanto teórico quanto prático, dos conhecimentos adquiridos durante o período de graduação, lapidando o conhecimento técnico e preparando o discente para o mercado de trabalho.

2. Descrição dos Locais de Estágio

2.1. Embriovita Reprodução Animal

Está localizada na Av. Aldo Borges Leão, km 5, zona rural de Uberlândia, maior cidade do triângulo mineiro, região que possui destaque para o agronegócio, que possui fazendas de gado de corte e leite ao seu redor, o que favorece a utilização dos serviços prestados pela empresa.

Possui laboratório equipado para a produção *in vitro* de embriões (PIVE; Figura 1), sua principal atividade, e conta com duas embriologistas, uma bióloga e outra médica veterinária, além de três médicos veterinários que atuam no campo, sendo um responsável pela OPU e transferência de embriões (TE), outro pelo diagnóstico de gestação e TE e o terceiro pela seleção dos oócitos coletados.



Figura 1. Laboratório de produção *in vitro* de embriões da Embriovita Reprodução Animal.

2.2. Embryoplus Brasil

Está localizada no Sítio Santa Cruz, S/N, no bairro Chapadão na cidade de Monte Mor (SP), na região metropolitana de Campinas. Além de um

laboratório para a PIVE, é integrada à uma cabanha (Cabanha Luxor), a qual produz genética de ovinos das raças Dorper e White Dorper.

Os embriões produzidos *in vitro*, são tanto da espécie bovina quanto da ovina. A Embryoplus conta com um time de quatro veterinários: uma laboratorista, uma responsável pela cabanha, um pelas biotecnologias da reprodução de bovinos e um pelas biotecnologias da reprodução de ovinos.

2.3. Lagoa da Serra LTDA/ CRV Brasil

Localizada na Rodovia Carlos Tonanni, km 88 em Sertãozinho, SP, região nordeste do estado, é uma cooperativa internacional de melhoramento genético. Com sede na Holanda, a CRV comercializa mais de 11 milhões de doses de sêmen ao redor do mundo e está presente com centrais e escritórios próprios na Austrália, África do Sul, Alemanha, Bélgica, Brasil, Espanha, Estados Unidos, Holanda, Reino Unido, Luxemburgo, Nova Zelândia e República Tcheca, além de representantes distribuídos em aproximadamente 60 países.

A CRV disponibiliza genética de reprodutores de diferentes raças de corte e leite, de alto valor zootécnico. A Central coloca à disposição dos criadores sêmen convencional e sexado, nacional e importado. Para isso, em Sertãozinho possui uma estrutura de armazenamento sofisticada, com capacidade para mais de duas milhões de doses.

Além da venda de genética, a CRV Lagoa possui diversos programas de melhoramento genético, oferecidos aos produtores, como os programas: PAINT, IFert, Clarifide, entre outros, no qual cada um é voltado para uma aptidão na bovinocultura (corte ou leite).

3. Descrição das Atividades de Estágio

3.1. Embriovita Reprodução Animal

Durante o período de estágio, pode acompanhar as atividades a campo, como a aspiração folicular (OPU), seleção de oócitos, transferência de embriões (TE), diagnóstico de gestação e sincronização das receptoras.

No protocolo de sincronização de receptoras, auxiliou na avaliação dos ovários das vacas, feita por ultrassonografia transretal, para observar se o animal estava apto a ser sincronizado, como também auxiliou na aplicação dos hormônios necessários para o procedimento.

Já na aspiração folicular, os equipamentos necessários para realização da OPU (Figura 2), como a técnica é realizada, quais os procedimentos necessários para que o animal não sinta dor ou incomodo e, também, pôde auxiliar na seleção e contagem de oócitos, onde pôde aprender como a classificação dos oócitos é feita antes de serem levados ao laboratório, em que passam por diversas etapas da PIVE, nas quais são maturados, fecundados e cultivados.



Figura 2. Mesa com materiais necessários para aspiração folicular (OPU): A: Tela LCD acoplada ao aparelho de ultrassom; B: Bomba à vácuo; C: Probe microconvexa; D: guia de aspiração.

Durante a etapa de transferência de embriões, pôde auxiliar na preparação das bainhas com as palhetas de embrião para inovulação, na ultrassonografia dos ovários para avaliar a ocorrência de ovulação, entender como a técnica é feita e o protocolo feito para que ocorra bem-estar animal na hora da transferência.

O diagnóstico de gestação era feito em duas etapas, a primeira 30 dias após a gestação e a segunda com 60 dias de gestação, na qual também é feita a sexagem dos animais. Nessa etapa, conseguiu ter maior familiaridade em interpretar as imagens do ultrassom e melhorar a capacidade de distinguir a anatomia dos órgãos e diferenciar qual imagem ultrassonográfica caracteriza uma fêmea prenhe ou vazia.

3.2. Embryoplus

Teve a oportunidade de acompanhar e auxiliar na parte laboratorial da PIVE, além disso, como a empresa era integrada à uma cabanha, pode também acompanhar os manejos diários dos ovinos. Durante a rotina do laboratório, pode-se acompanhar todas as etapas da PIVE, desde a seleção dos oócitos a campo até a maturação, fecundação e cultivo *in vitro*.

Após a aspiração folicular, o conteúdo era levado a um laboratório improvisado na fazenda, onde os oócitos recuperados eram selecionados, e divididos em viáveis (separados em três graus, de acordo com a quantidade de células do cumulus presentes e aspecto do citoplasma) ou inviáveis (divididos em atrésicos, desnudos ou degenerados; Figura 3). Os oócitos viáveis eram acondicionados em criotubos onde iniciavam a maturação e eram levados ao laboratório.

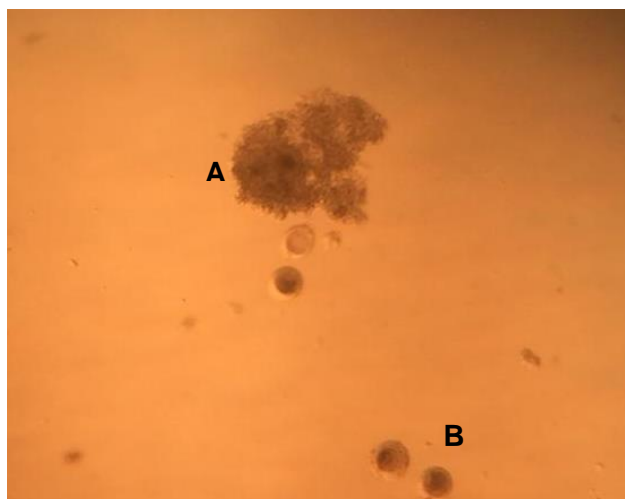


Figura 3. Oócitos de ovinos de grau 1 (A) e desnudo (B).

A maturação levava em média cerca de 20 a 23 horas, a partir daí, iniciava-se o processo de fertilização *in vitro*. Após definido o acasalamento, o

sêmen escolhido passava pelo processo de gradiente de Percoll, e era transferido para a gota na qual estavam os oócitos, este processo levava em média 24 horas.

Depois desse período, ocorria o cultivo, o qual durava 7 dias, e no dia 3 e 6 o meio de cultivo era renovado, para fornecer mais nutrientes aos embriões. No sétimo dia, ou os embriões eram envazados para transferência a fresco ou eram criopreservados (Figura 4), pelo processo *direct transfer* (DT).



Figura 4. A: Palhetas com embriões envazados para transferência à fresco; B: Embriões em processo de congelamento.

As atividades da cabanha envolviam o manejo reprodutivo, como protocolos hormonais de sincronização de receptoras, de superovulação de doadoras, aspiração folicular por laparoscopia (LOPU; Figura 5), transferência de embriões, diagnóstico de gestação e assistência ao parto. Também incluía o manejo sanitário, como vacinação, cura de umbigo, vermifugação, teste de famacha e contagem de ovos por grama de fezes (OPG), além disso, foi possível auxiliar e diagnosticar as enfermidades presentes no rebanho, bem como tratá-las. Além disso, pôde participar de cirurgias, tais como, ruminotomia, cesariana, exérese cirúrgica de orelha externa e caudectomia dos borregos.

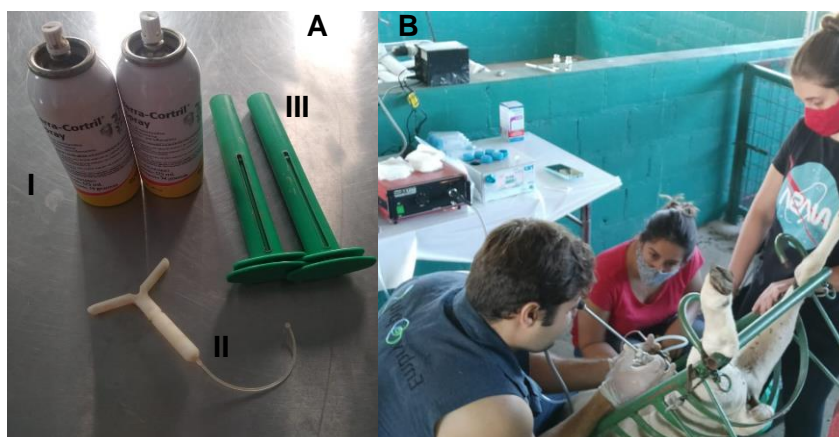


Figura 5. A: I: spray de terracotril® para aplicar no CIDR; II: CIDR®: dispositivo intravaginal de progesterona para pequenos ruminantes; III: aplicador do dispositivo. B: Aspiração de óocitos por laparoscopia (LOPU) em ovelha Dorper.

Durante o estágio, também foi possível acompanhar assistência reprodutiva de pequenos ruminantes em uma fazenda em Itanhaém, SP, auxiliando o Médico Veterinário Matheus Castro no diagnóstico de gestação de 86 ovelhas, das raças White Dorper e East Friesian e de 317 cabras (Figura 6), das raças Saanen, Anglo-nubiana, Boer, Toggenburg, Alpina, Murciana e Khalahari.



Figura 6. Contenção em Cabra Saanen para diagnóstico de gestação.

3.3. Lagoa da Serra LTDA/ CRV Brasil

Durante o período de estágio, as atividades da discente foram: auxílio nos RAs (Registro de Atendimento), análise de laudos das partidas de sêmen, auxílio na atualização dos catálogos dos touros, organização do evento anual do Clube Vet Líder.

O RA é uma ferramenta na qual o cliente pode registrar reclamações em relação aos produtos ou serviços oferecidos pela empresa. Por meio deste, é possível investigar o problema e, caso constatado que ocorreu por conta da empresa, o cliente é ressarcido. As categorias dos registros são desde qualidade do sêmen (baixa taxa de prenhez, baixa taxa de produção de embriões), problemas na palheta (palheta quebrada, estoura ao descongelar), análise de rotina (nível baixo de nitrogênio no botijão, por exemplo), problemas no botijão de nitrogênio, produto trocado (comprou sêmen do touro A e recebeu do touro B).

Toda partida de sêmen, antes de ser comercializada, é analisada em: concentração total, motilidade total, células progressivas, células viáveis, vigor, integridade de membrana, entre outros. A partir destas análises, a partida é avaliada em apta, podendo ser comercializada, ou inapta.

Os laudos emitidos para cada partida eram analisados e, caso estivesse dentro dos padrões estabelecidos pela empresa, seria classificada como apta, caso contrário, estaria inapta, e não poderia ser comercializada.

Todos os anos os catálogos de touros são atualizados, tanto retirando touros que saíram do portfólio, adicionando os novos, como atualizando as provas dos programas de melhoramento genético dos quais os touros fazem parte. A

discente auxiliou na revisão dos dados dos touros que entrariam no próximo catálogo, tanto as provas como a genealogia dos touros.

4. Discussão das atividades desenvolvidas

4.1. Embriovita Reprodução Animal

Durante os dois meses de estágio, visitaram-se 66 propriedades, tanto de gado leiteiro como de corte, em diferentes sistemas de criação. Como a empresa abrange todas as etapas da PIVE, algumas fazendas foram visitadas mais de uma vez.

A maioria das fazendas visitadas foram de produção leiteira, totalizando 47 propriedades (71%) de criadores das raças Gir, Girolando e Holandesa. Nas fazendas de corte (19 propriedades, ou seja, 29%), em sua maioria, criavam-se a raça Nelore, entretanto, em alguns casos eram Sindi e Angus/ UltraBlack.

4.2. Embryoplus

Na rotina do laboratório, foi possível acompanhar a produção de 463 embriões (Tabela 1) de 12 propriedades, em sua maioria de gado de corte (67%), seguido por gado leiteiro (28%), e em um dos casos, embriões de ovinos (5%) da raça Dorper e White Dorper. Destes embriões, 199 foram criopreservados, enquanto 264 foram transferidos a fresco.

Tabela 1. Produção de embriões por cliente.

DATA	CLIENTE	TE	DT	RAÇA
08/03/2021	1	78	30	Brangus
08/03/2021	2	30	64	Brahman
10/03/2021	3	26	-	OVINOS
12/03/2021	4	10	-	Girolando
15/03/2021	5	-	12	Girolando
16/03/2021	6	20	-	Nelore
16/03/2021	7	-	11	Nelore Pintado
18/03/2021	8	38	12	Gir
20/03/2021	9	12	13	Gir
21/03/2021	10	50	26	Nelore
22/03/2021	11	-	21	Girolando
31/03/2021	12	-	10	Gir

TE: transferência à fresco; DT: criopreservação (Direct Transfer). **FONTE:** Embryoplus Brasil, 2021.

4.3. Lagoa da Serra LTDA/ CRV Brasil

Durante o período de estágio, uma das funções pela qual a discente era responsável, era a análise de laudos das partidas das palhetas de sêmen. Antes de comercializar as doses de sêmen, eram feitas análises dos parâmetros seminais das partidas após o descongelamento. Tal análise era feita na Central Bela Vista, pelo veterinário responsável, no qual avaliavam as características físicas (concentração, motilidade e vigor) e morfológicas (defeitos maiores, menores e totais).

Os parâmetros utilizados pela CRV para a análise do sêmen congelado são: motilidade total (>40%), Motilidade progressiva (>30%), Vigor (≥ 3), Defeitos maiores (<20%), Defeitos menores (<20%) e Defeitos totais (<30%). Estes parâmetros são considerados parâmetros eliminatórios, ou seja, caso qualquer um deles esteja fora do esperado, o sêmen é considerado inapto, não podendo ser comercializado.

Ao todo, foram analisadas 1360 partidas de 72 touros de 11 raças diferentes de aptidão para corte. As métricas das análises estão expostas nas Figuras 7 e 8.

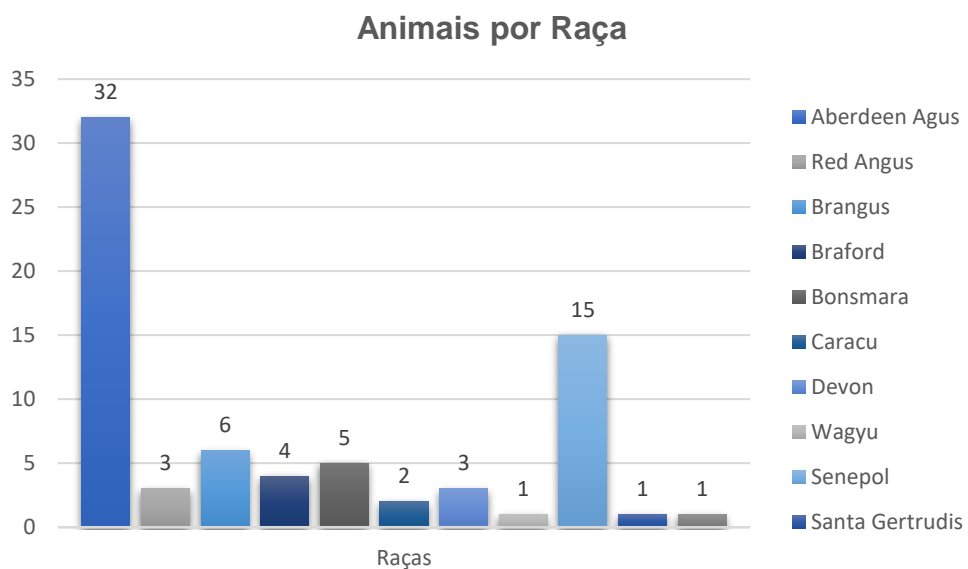


Figura 73. Número de animais por raça avaliados durante o período de estágio

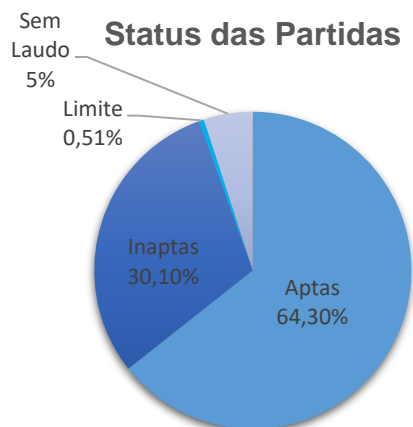


Figura 8. Porcentagem de partidas aptas, inaptas, ou estiveram nos limites estabelecidos de acordo com os parâmetros seguidos pela empresa; ou sem laudo, partidas que não tiveram laudos apresentados.

5. Conclusão

A experiência obtida por meio do estágio curricular obrigatório, pôde proporcionar à aluna grande conhecimento técnico na área de reprodução bovina e de pequenos ruminantes, devido ao acompanhamento de diversas biotecnologias aplicadas à área, como a PIVE, passando por todas as etapas, da parte laboratorial à campo. Além disso, pode ter a vivência de como é trabalhar em uma empresa multinacional, bem como acompanhar todos os processos envolvidos para comercialização de sêmen bovino.

Além da parte prática, o estágio agregou conhecimentos como relacionamento com o cliente e colegas de trabalho. Desta forma, a discente pode aplicar a teoria aprendida durante a graduação no mercado de trabalho, o que proporcionou crescimento tanto profissional como pessoal.

II. Assunto de interesse: Produção *in vitro* de embriões bovinos

Resumo: O Brasil é um dos maiores produtores de embriões bovinos *in vitro* do mundo, tendo em vista a grande importância do agronegócio para o país. Diante disto, objetivou-se analisar e discutir dados de 25 protocolos de PIVE, desde a OPU até o diagnóstico de gestação e sexagem, na empresa Embriovita Reprodução Animal, durante os meses de outubro a dezembro de 2020. Foram aspirados 5.065 oócitos viáveis de 295 doadora (média de 17,2 oócitos viáveis/ doadora), resultando em 1.140 embriões (22,5%). Desse montante, 762 embriões foram efetivamente transferidos, no diagnóstico de gestação aos 30 dias encontrou-se uma taxa de prenhez de 36,2%, já na confirmação aos 60 dias a taxa foi de 25,3%, sendo aproximadamente 30% machos e 70% fêmeas. Neste relato, observou-se grande variação dos resultados devido à heterogeneidade de raças, status nutricional, tipo de produção, entre outros fatores dos rebanhos atendidos, observando-se melhores resultados em rebanhos mais bem manejados.

Palavras-chave: Bovinos; Transferência de Embriões.

II. Subject of interest: *In vitro* production of bovine embryos

Abstract: Brazil is one of the greatest *in vitro* bovine embryo producers in the world, due the importance of agribusiness for the country. Therefore, the objective was to analyze and discuss data from 25 *in vitro* embryo production, from OPU to diagnosis of pregnancy and sexing in Embriovita Animal Reproduction, during October to December 2020. In total, 5.065 viable oocytes from 295 donors were collected (on average 17,2 viable oocytes / donors), resulting in 1.140 embryos (22,5%). From the total of embryos, 762 embryos were effectively transferred, resulting in 30 days pregnancy rate (PR) of 36,2% and 60 days PR of 25,3%, with approximately 30% male and 70% female. In this report, there was a great variation in the results due to herd heterogeneity of breed, nutritional status, production, among other factors, with better results being observed in herds better managed.

Key-words: Bovines, Embryo Transfer

1. Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia ligada à reprodução animal que tem como finalidade o melhoramento genético e o aumento da eficiência produtiva do rebanho (GONÇALVES et al., 2002).

Os primeiros estudos sobre fertilização *in vitro* foram feitos em oócitos de estrelas do mar, uma vez que, diferente do que ocorre nos mamíferos, a fecundação dessa espécie ocorre fora do sistema reprodutor feminino. Em mamíferos os estudos iniciaram em 1935, mas só obtiveram sucesso em 1951, com a descoberta da capacitação espermática. Com isso, foi possível fazer a fecundação *in vitro* de oócitos de coelha, com espermatozoides capacitados *in vivo* (MELLO et al., 2016; VARAGO et al., 2008; GONÇALVES et al., 2002).

O nascimento do primeiro bezerro produto de FIV ocorreu em 1982 nos EUA, como relatado por Brackett et al. (1992). No final da década de 80, observou-se que a PIVE poderia ser completamente viabilizada sob condições artificiais, o que gerou aumento no uso da técnica (GONÇALVES et al., 2002).

No Brasil, até o final da década de 1990, a PIVE ainda era uma tecnologia restrita aos pesquisadores (LIMA, 2014), devido a seu elevado valor. Entretanto, em 2014, o país foi considerado o maior produtor mundial de embriões, produzindo 366.517 embriões por ano, cerca de 70% do total mundial (IETS, 2014).

Em 2017, pela primeira vez, em âmbito mundial, foi registrada a maior produção de embriões *in vitro* em relação aos produzidos *in vivo*, entretanto, neste mesmo ano os EUA ultrapassaram o Brasil na produção de embriões (421.123 e 345.528, respectivamente), porém, o número de embriões

efetivamente transferidos continuou maior no Brasil, 231.424 nos EUA contra 343.811 no Brasil. Apesar dos EUA liderarem o ranking mundial, o Brasil ainda é responsável por 34,8% da produção mundial, sendo um grande expoente neste segmento (VIANA, 2018).

O que leva a esse sucesso, é a importância econômica do setor agropecuário para o país, que atualmente possui o maior número de cabeças de gado comercial e é o maior exportador de carne bovina do mundo (FAO, 2019). O rebanho nacional, composto, em sua maioria, por raças zebuínas, as quais apresentam maior produção de oócitos por coleta também contribuem para o resultado brasileiro (MELLO et al., 2016).

Portanto, no presente trabalho o objetivo é relatar resultados de produção comercial de embriões bovinos *in vitro* e avaliar os fatores que influenciam as taxas encontradas frente à literatura.

2. Revisão de Literatura

2.1. Vantagens da utilização da produção *in vitro* de embriões

Levando em conta a natureza da fêmea, o potencial genético fica restrito a um bezerro por ano, sendo assim, a PIVE tem como finalidade acelerar o processo de melhoramento genético, tornando-o mais eficiente, uma vez que aumenta o número de produtos de uma fêmea de alto valor genético (HONORATO et al., 2013).

Além disso, vacas prenhes podem ser submetidas à aspiração folicular por via vaginal durante o primeiro trimestre de gestação, sem que ocorram danos

ao animal e à prenhez. Também podem ser submetidas ao processo vacas no pós-parto, a partir da segunda ou terceira semana. Ademais, as aspirações podem ser feitas a cada 15 dias (MENTIJES et al., 1995; VIANA e BOLS, 2005; BECHER et al., 2018).

Há, também, maximização do uso do sêmen, possibilitando maior produção de embriões com doses de maior valor comercial, inclusive o sêmen sexado (FABER et al., 2003). Outro ponto importante é a possibilidade de utilizar fêmeas geneticamente superiores, que possuam distúrbios reprodutivos adquiridos, que não sejam de caráter hereditário (REICHENBACH et al., 2002). Possibilita também a utilização de bezerras pré-púberes como doadoras, desta forma o ganho genético ocorre por meio da diminuição do intervalo de gerações (TANEJA et al., 2000).

2.2. Etapas da PIVE

Essa biotecnologia depende de três etapas biológicas para ocorrer, sendo assim, após a obtenção dos oócitos - *in vivo*, por meio da aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU) ou *post mortem*, a partir de ovários de animais abatidos - estes passam pela maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV; MELLO et al., 2016).

Os estudos e aprimoramentos destas técnicas, aumentaram a eficiência e permitiram a aplicação da PIVE em escala comercial, o que incrementa a produtividade na pecuária e possibilita pesquisas de novas biotecnologias (SANGILD et al., 2000).

O processo de PIVE (Figura 9), na maioria dos laboratórios é de 9 dias, podendo ser interpretado da seguinte maneira: no dia -1 (D-1), ocorre a OPU. Após 24 horas de MIV, realiza-se no dia 0 (D0) a FIV. Passadas 24 horas, inicia-se o dia 1 (D1), que corresponde à etapa de CIV, em que permanece até o dia 7 (D7), no qual acontece o envase, para transferência a fresco ou para criopreservação (DE SOUZA e ABADE, 2019).

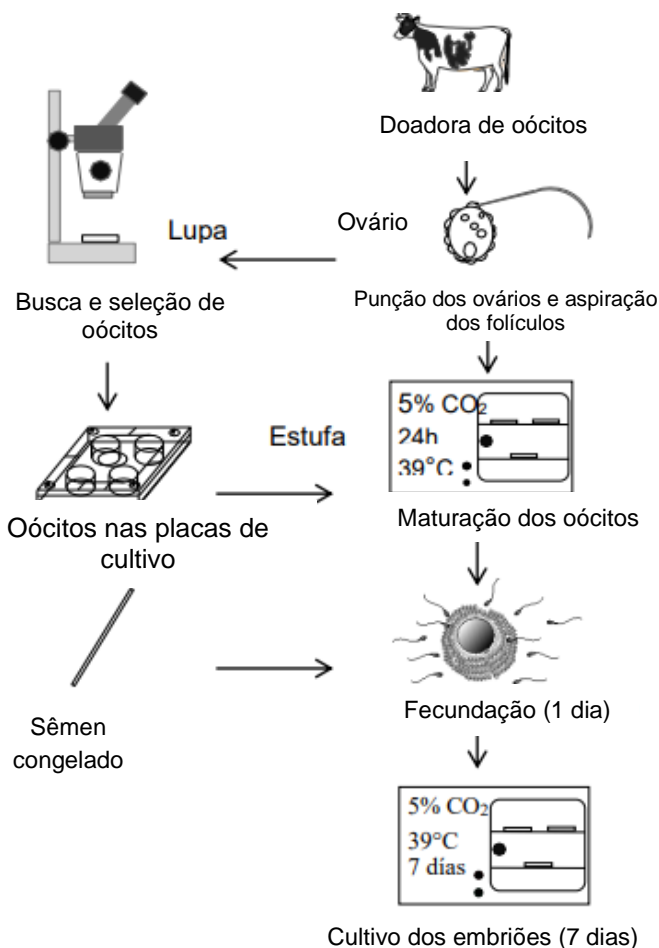


Figura 9. Etapas da produção de embriões in vitro. **FONTE:** Adaptado de Palma, 2001

2.2.1. Aspiração Folicular Guiada por Ultrassom

No interior do folículo, está presente o oócito, que por sua vez é envolto pelas células da granulosa, formando, assim, os complexos *cumulus*-oócito (COCs) (GONÇALVES et al., 2002).

Anteriormente à descrição da técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU; Figura 10), a obtenção dos COCs acontecia por meio de abordagens cirúrgicas ou laparoscopia. Atualmente, a OPU é a técnica de eleição para coleta dos COCs em doadoras vivas, por ser uma técnica menos invasiva do que as anteriores (GARCIA et al., 2004; VIANA e BOLS, 2005).

Para diminuir o desconforto do animal, bem como a diminuição dos movimentos peristálticos, aplica-se anestesia epidural, geralmente lidocaína associada à xilazina (HONORATO et al., 2013).

A punção folicular é realizada por agulha (cook volpal 1855 ou intradérmica descartável) acoplada a uma linha de aspiração e uma bomba à vácuo, que leva o líquido folicular para um tubo coletor. Para realizar a imagem do ovário, utiliza-se um aparelho de ultrassom com um transdutor microconvexo (de 5 ou 7,5 MHz), conectado à uma guia de aspiração, que é inserida no fundo vaginal. A manipulação retal ajuda a posicionar o ovário na probe (Figura 10 e 11), visualizando os folículos a serem aspirados (GOUVEIA, 2011; DE SOUZA e ABADE, 2019).

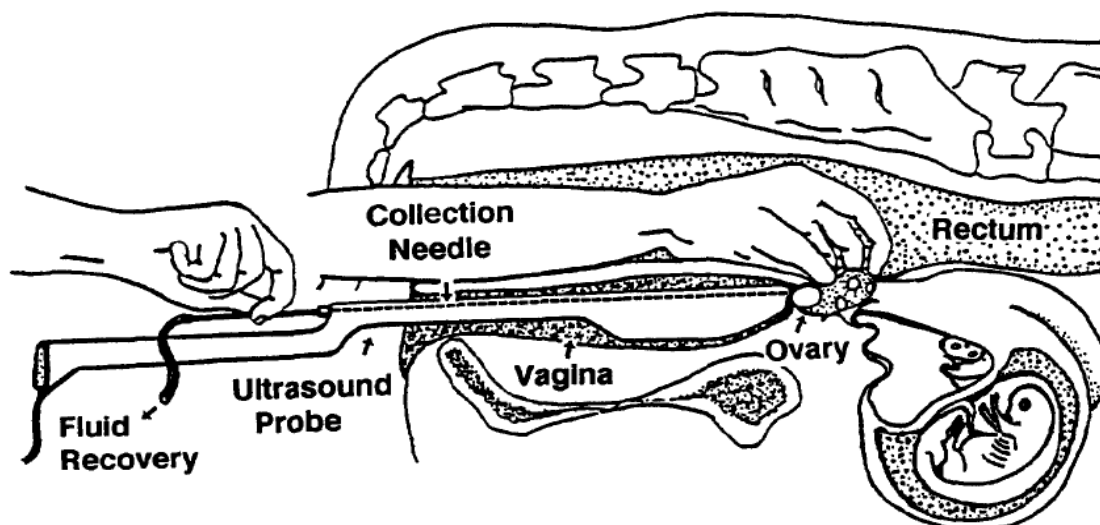


Figura 10. Aspiração folicular guiada por ultrassom: os oócitos são coletados dos ovários de uma vaca prenhe, pela punção dos folículos no fundo vaginal com uma agulha de 550mm e calibre 18. A coleta é auxiliada por um aparelho de ultrassom. O ovário a ser puncionado é corretamente posicionado na probe com auxílio de palpação transretal. **FONTE:** adaptado de Mentijes et al., 1995.

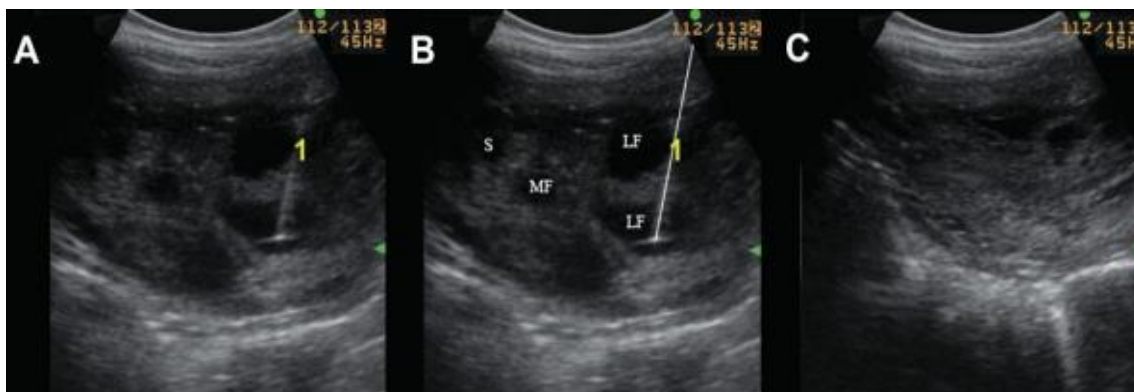


Figura 11. Ultrassonografia de ovário direito de uma vaca durante e após OPU, com probe microconvexa de 7,5 MHz acoplada à agulha. A e B: Agulha (1) atravessa o fórnix vaginal, enquanto, por manipulação retal, o ovário é manipulado, posicionando o folículo a ser aspirado. S: folículo pequeno; MF: folículo médio e LF: folículo maior. C: imagem após procedimento de aspiração folicular. (DESCÔTEAUX et al., 2010 apud GOUVEIA, 2011).

2.2.2. Seleção de Oócitos

Na etapa de seleção, os oócitos são classificados de acordo com as células do *cumulus* e do aspecto do citoplasma (de acordo com sua morfologia pelo número de camadas). Leibfried & First (1979) descreveram a seguinte classificação (Figura 12): Grau 1: cumulus compacto, com presença de 3 ou

mais camadas de células; Grau 2: cumulus compacto, porém parcialmente ou completamente presente ao redor do oócito, com menos de 3 camadas celulares; Grau 3: presença de cumulus, porém expandido, não cobrindo totalmente o oócito; Grau 4: não há presença de cumulus, oócito totalmente desnudo.

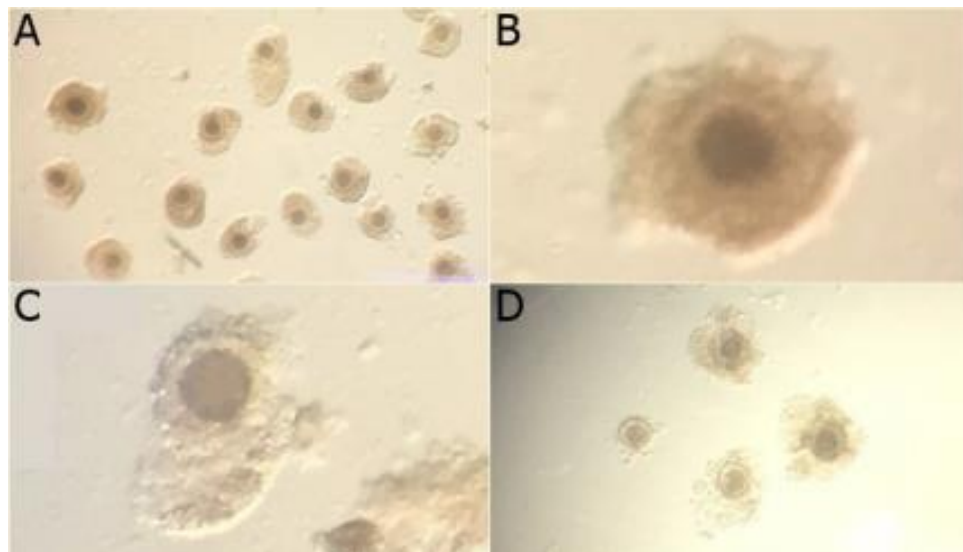


Figura 42. Oócitos classificados de acordo com Leibfried & First (1979). A: Grau 1 e 2; B: Grau 1 apresentando camada espessa e compacta das células do cumulus envolta de todo o oócito e ooplasma homogêneo. C: Grau 2 apresentando camada de células não tão espessa e compacta circundando o oócito, ooplasma homogêneo. D: Grau 3 apresentando células do cumulus expandidas e quase desnudo, ooplasma não homogêneo e com vacúolos. **FONTE:** Adaptado de KOCH et al., 2017.

Já em 1991, Loos et al. (apud TETZNER, 2007) descreveram outra maneira de classificar os oócitos: Grau I: revestimento com multicamadas de *cumulus* compacto, ooplasma homogêneo e complexo *cumulus*-oócito claro e transparente; Grau II: revestimento com 3 a 5 camadas de *cumulus* compacto, ooplasma homogêneo ou com regiões escuras na periferia; Grau III: pouco revestimento de células do *cumulus* (1 a 3 camadas) e ooplasma irregular com picnose; Grau IV / atrésico: *cumulus* expandido com células escuras e em grumos, e complexo *cumulus*-oócito escuro e irregular; Desnudo: sem camadas do *cumulus* e com ooplasma uniforme ou com granulações.

Oócitos com maior potencial de viabilidade são aqueles que apresentam ooplasma homogêneo com granulações finas, de coloração marrom e completamente envolvidos por várias camadas de células do cumulus dispostas de forma compacta. Após a seleção, os oócitos são levados ao laboratório e, os de grau I, II e III são utilizados, enquanto os de grau IV e desnudos são descartados (GONÇALVES et al., 2002).

Segundo Carneiro et al. (2019), o período do ano influencia na qualidade dos oócitos aspirados. Como demonstrado na Tabela 2, durante os meses de inverno, obteve-se maior quantidade de oócitos de grau I e II, enquanto nos meses que compreendem o período de verão, oócitos de grau III e desnudos tiveram maior incidência.

Tabela 2. Qualidade de complexo *cumulus* oócitos de fêmeas bovinas, provenientes de abatedouro nas estações de verão e inverno.

Estação/ano	Grau I	Grau II	Grau II	Desnudo	Atrésico
Inverno	539a	404 ^a	681a	540a	62
Verão	36b	237b	1879b	849b	41
P valor	0,00	0,04	0,00	0,04	0,22

FONTE: Adaptado de CARNEIRO et al., 2019.

O transporte dos oócitos é feito em incubadora portátil em meio de maturação líquido suplementado com gás mimetizando o ambiente da incubadora e não deve ultrapassar 8 horas do início da aspiração da primeira vaca até a chegada ao laboratório (HONORATO et al., 2013). Entretanto, Cavalieri et al. (2015) e Loiola et al. (2014), analisaram o transporte de oócitos por 48 horas após a aspiração, não evidenciaram efeitos negativos na produção

de embriões, o que permite realizar a PIVE mesmo quando feita a grandes distancias.

2.2.3. Maturação *in vitro* (MIV)

No animal, o oócito fica bloqueado a partir do início da primeira meiose até a puberdade, ponto no qual a fêmea possui aproximadamente 70.000 oócitos (zebuínos) e 130.000 oócitos (taurinos) em seus ovários, nesta fase também se inicia o recrutamento de folículos. *In vivo* o crescimento e maturação dos oócitos ocorrem durante as ondas foliculares com intervalos regulares, por ação das gonadotrofinas e de outros hormônios de ação endócrina e parácrina, desta forma, apenas o folículo dominante acaba ovulando, enquanto os menores entram em atresia. Por conta disso, em toda a sua vida reprodutiva, a fêmea produz apenas cerca de dez descendentes. (HARDY et al., 2000; HAFEZ e HAFEZ, 2000; GILCHRIST et al., 2008; ORISAKA et al., 2009; TRIPATHI et al., 2010; SANTOS et al., 2010).

A maturação oocitária ocorre em dois passos interrelacionados e integrados: a maturação nuclear, que corresponde à finalização da meiose (TRIPATHI et al., 2010) e a citoplasmática, que envolve a redistribuição das organelas citoplasmáticas, rearranjo do citoesqueleto e maturação molecular (FERREIRA et al., 2009).

A retirada do CCO (complexo *cumulus*-oócito) do folículo faz com que a meiose seja retomada precocemente, sem que a maturação citoplasmática tenha sido completada, o que compromete a sincronia entre a maturação nuclear e a citoplasmática (GULART, 2015). A completa maturação nuclear é atingida

quando há ativação do oócito em estágio de vesícula germinativa (VG) e seu rompimento, até a segunda parada meiótica em metáfase II (MII), como mostrado na Figura 13. Neste estágio, o oócito passa a ser secundário, permanecendo neste estágio (MII) até ser fertilizado pelo espermatozoide ou sofrer atresia (LANDIM-ALVARENGA, 2006).

Oócitos que não possuem sincronicidade entre as maturações (nuclear e citoplasmática), não serão fecundados ou não vão conseguir avançar no desenvolvimento embrionário. Desta maneira, podem ser utilizados meios que retardem a maturação nuclear, para que ocorra maior sincronicidade entre os processos (GONÇALVES et al., 2002; GULART, 2015).

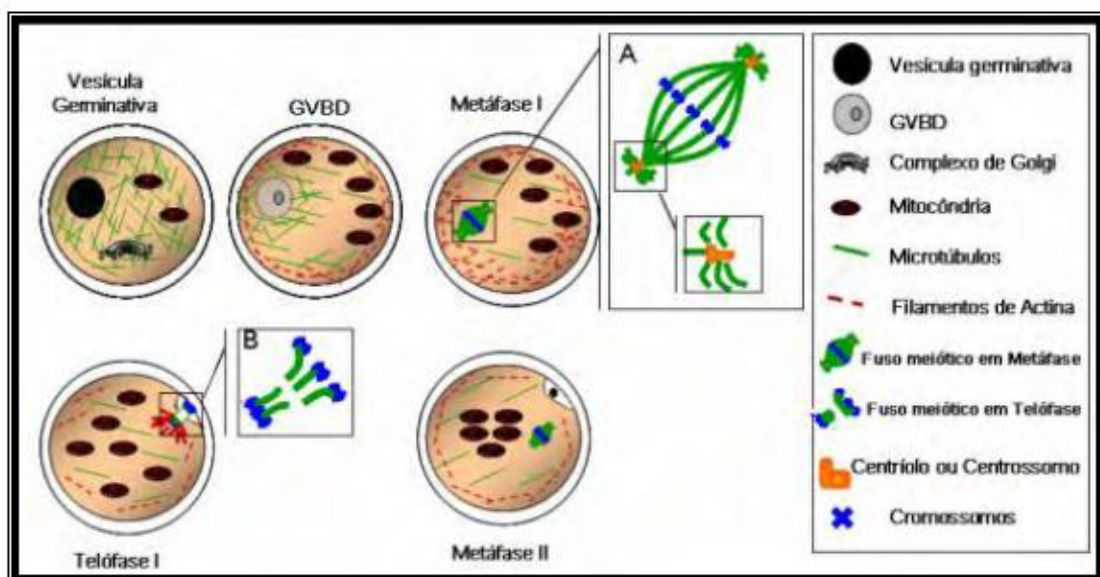


Figura 5. Dinâmica dos cromossomos durante a maturação oocitária em bovinos. A: fuso meiótico em metáfase I; B: fuso meiótico em telófase I. **FONTE:** adaptado de FERREIRA et al., 2009

Para que a maturação dos oócitos *in vitro* ocorra, é preciso que os meios utilizados estejam em condições de atmosfera a 5% CO₂ (dióxido de carbono), ou seja, de alta tensão de O₂ ou atmosfera de baixa tensão de O₂, com 5% CO₂,

5% O₂, 90% N₂ (nitrogênio) em temperatura próxima aos 39°C, umidade saturada e com baixa incidência de luz, uma vez que a luminosidade desnatura os oócitos, por 22 a 24 horas. (GONÇALVES, 2002; GULART, 2015; CAMPELO et al., 2016).

O meio de maturação mais utilizado atualmente é o TCM 199 (Tissue Culture Medium), que geralmente é acrescido com outras substâncias como o soro fetal bovino (SFB) e gonadotrofinas (FSH, LH e estradiol-17 β), aminoácidos como L-glutamina, bicarbonato de sódio, piruvato de sódio, lactato, vitaminas e antibióticos (GUEMRA et al., 2013).

Um ponto que deve ser levado em consideração é o estresse oxidativo sofrido pelos oócitos durante o processo de MIV, desta forma, as células do *cumulus* desempenham um papel essencial, pois protegem os oócitos desse estresse. Um dos eventos que ocorrem durante a MIV é a expansão das células do *cumulus*, em que projeções destas células atravessa a ZP formam junções com o oócito (gap), durante a MIV, inicia-se síntese de ácido hialurônico, que se deposita entre elas, causando a expansão (GONÇALVES, 2002; SANTOS et al., 2010).

2.2.4. Fertilização *in vitro* (FIV)

2.2.4.1. Métodos de preparação espermática para FIV

A qualidade dos espermatozoides, como a dos oócitos, interfere no sucesso da técnica. Normalmente, utilizam-se palhetas de sêmen congelado, convencionais ou sexados e, durante os processos de criopreservação e

sexagem, ocorrem danos celulares a alguns espermatozoides (SANTOS et al., 2010).

Segundo GONÇALVES et al., (2002) e GALLI (2003) a técnica mais utilizada para obtenção dos espermatozoides é a centrifugação em gradiente de Percoll, porém existem outras técnicas como o *swin-up* e centrifugação simples, que são menos utilizadas. O gradiente de Percoll promove maior recuperação espermática quando comparado à técnica de *swin-up*, entretanto, a qualidade e viabilidade dos espermatozoides recuperados são parecidas nas duas técnicas (SANTOS et al., 2010).

A técnica do gradiente de Percoll é capaz de recuperar a maioria dos espermatozoides viáveis, remover substâncias tóxicas e bioativas, além dos espermatozoides mortos e outras células presentes, como os microrganismos. Dessa maneira, proporciona-se o processamento de grandes volumes, bem como permite controlar a concentração e volume final da suspensão espermática (SANTOS et al., 2010).

O Percoll é preparado em diferentes concentrações para formar um gradiente para separação espermática (GONÇALVES et al., 2002). Em um tubo adiciona-se Percoll na concentração 90%, em seguida a 45% (proporção 1:1) e a dose do sêmen a ser utilizada. O tubo é submetido a duas centrifugações de 10000 rpm (ou 1120 g) por 20 minutos, para sêmen convencional, ou de 5000 rpm (ou 560 g) para sêmen sexado. O sobrenadante é descartado e o pellet é homogeneizado em 2mL de meio de FIV e centrifugado por mais 3 minutos, para remoção de resíduos de Percoll. Em seguida, retira-se o material precipitado (pellet), que é, geralmente, ajustado na concentração 1×10^6 (GOUVEIA, 2011).

Capacitação espermática

Em mamíferos, os espermatozoides, logo após a ejaculação, não são capazes de fecundar os oócitos. Para que isso ocorra, devem passar pelo trato genital feminino, o que leva à chamada capacitação espermática (SANTOS et al., 2010). Esse processo envolve a desestabilização da membrana plasmática e hiperativação espermática (VARAGO et al., 2008).

A capacitação espermática, *in vitro*, ocorre por adição de glicosaminoglicanos aos meios de fecundação, como, por exemplo, a heparina, que está presente no trato genital da fêmea (VARAGO et al., 2008). Para que a capacitação do espermatozoide ocorra de maneira correta, os meios de fertilização devem mimetizar o fluido presente no oviduto, por isso, além da heparina, deve conter piruvato, lactato, glicose, albumina sérica (BSA), cálcio, potássio e sódio (ANDREOTI, 2007).

Segundo Gonçalves et al. (2002), a concentração ideal de heparina varia de 2 a 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de meio, dependendo do touro e do processo de separação utilizado. Em muitos casos os aminoácidos penicilamina, hipotaurina e epinefrina (PHE), também são adicionados aos meios, a fim de aumentar a atividade espermática e facilitar a penetração no oócito (PALMA, 2001; GONÇALVES et al., 2002).

2.2.4.2. Fecundação *in vitro*

A fecundação acontece quando há união dos gametas masculinos e femininos, formando um novo indivíduo. Os processos da fecundação têm início pela passagem do espermatozoide através das camadas celulares e acelulares

que circundam o oócito, penetrando o citoplasma e formando os pró-núcleos femininos e masculinos e, por fim, a singamia (MELLO et al., 2016).

A enzima hialuronidase, que está presente na membrana plasmática do espermatozoide, permite que o gameta masculino atravesse a camada de células do *cumulus*, se ligando ao ácido hialurônico presente nessas células. A hipermotilidade dos espermatozoides permite que estes migrem em direção à zona pelúcida (ZP). Ao alcançar a ZP, ocorrerá a reação acrossômica, na qual há fusão das membranas acrossomais e liberação de enzimas acrossômicas, permitindo que o espermatozoide penetre a ZP (PALMA, 2001; OLIVEIRA et al., 2014).

No momento da fecundação, na passagem do espermatozoide pela membrana vitelínica do oócito, desencadeia-se a ativação do gameta feminino, o que causa o bloqueio dos demais espermatozoides. Além disso, o oócito retoma sua atividade metabólica e conclui a divisão meiótica (MII), com a expulsão do segundo corpúsculo polar. Então, inicia-se a descondensação da cromatina haploide dos gametas, seguida da dissolução da membrana nuclear, condensação dos cromossomos e ordenamento de um plano equatorial (singamia), até o fim da mitose (PALMA, 2001).

A FIV (Figura 14) ocorre a partir do cultivo dos oócitos maturados com os espermatozoides em meio de fertilização (LUEDKE, 2018). O meio no qual os gametas são depositados, além de ser adequado para a capacitação espermática, deve permitir o metabolismo dos oócitos e das células do *cumulus*, e manter a capacidade espermática eficiente para a fecundação (GOUVEIA, 2011).



Figura 14. Ligação do espermatozoide na zona pelúcida do oócito. **FONTE:** MARTINS et al.,2016

O meio mais comumente utilizado é o FERT-TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato), que além de possuir heparina (GONÇALVES, 2002), pode ser suplementado com sulfato de gentamicina, penicilamina, hipotaurina e epinefrina, substâncias importantes para a motilidade progressiva e suporte do gameta masculino (MELLO et al., 2016).

Após maturados, os oócitos são lavados por três vezes seguidas em meio FERT-TALP, a fim de retirar todo o meio de maturação presente, e transferidos para gotas do mesmo meio, então, são adicionados os espermatozoides selecionados (PENARIOL et al., 2017).

Para que a fecundação ocorra, os gametas devem estar em um ambiente adequado: com temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ e umidade saturada, diante disso, após um período de 18 a 22 horas, a fertilização é concluída, e há formação dos zigotos (GONÇALVES et al., 2002).

2.2.5. Cultivo embrionário *in vitro* (CIV)

O CIV, tem duração de 7 dias e é a etapa que corresponde do desenvolvimento do zigoto, ou seja, logo após a FIV, até o estágio de blastocisto (SANGILD, 2000). O meio deve ser composto por fluidos presentes no ambiente uterino e oviduto durante o início da gestação. Esses meios podem ser KSOM, SOF ou TCM-199 (Gonçalves et al., 2002).

Durante o período de pré-implantação, ocorrem eventos como o processo de divisão celular (clivagem), ativação do genoma embrionário, agregação e compactação dos blastômeros (estádio de mórula), diferenciação do trofoblasto e embrioblasto, formação e expansão da blastocela e rompimento da zona pelúcida (SANTOS, 2010).

Para dar início ao cultivo *in vitro*, após as 24 horas da FIV, é necessário retirar o *cumulus* que circunda os possíveis zigotos, que pode ser feito pela utilização de vórtex ou pelo método de aspirações sucessivas com o uso de uma pipeta de vidro com diâmetro ligeiramente superior ao zigoto. Após a retirada das células do *cumulus*, os possíveis zigotos são transferidos para uma placa de Petri, para iniciar o cultivo *in vitro* (GONÇALVES et al. 2002).

Existem dois tipos de cultivo embrionário *in vitro*, com presença ou ausência de células somáticas. O cultivo com uso de células somáticas, é chamado de co-cultivo e as células mais utilizadas são as células do oviduto, células da granulosa, células VERO (linhagens celulares estabelecidas para cultivo) e células BRL (Buffalo Rat Liver Cells; HOSHI, 2003; BUENO e BELTRAN, 2008).

Por questões de praticidade e economia, o co-cultivo com células somáticas tem sido menos utilizado atualmente e vem sendo substituído pelos sistemas de baixa tensão (5% de O₂, 5% de CO₂, 90% de N₂) e umidade saturada a 39°C com meios simples como o SOF (Fluido de oviduto sintético) e KSOM (meio simples de potássio otimizado) acrescidos de aminoácidos. Esses sistemas podem ser utilizados com meios quimicamente definidos ou com soro sanguíneo (AVELINO et al., 2002; GONÇALVES et al., 2002).

A “Síndrome do Bezerra Gigante” (LOS – Large Offspring Syndrome), causa prolongamento de gestação, distocia, aumento mortalidade pré-natal e de peso corpóreo, estudos comprovam que grande parte das alterações estão relacionadas ao co-cultivo de células da granulosa ou à alta concentração de soro fetal bovino no meio de cultivo (VARAGO et al., 2008). Atualmente, esse problema vem sendo resolvido utilizando-se menos ou nada de soro durante o cultivo embrionário, com isso, ainda é possível de ocorrer, porém é raro (SIRARD, 2017).

2.2.5.1. Clivagem

Após a formação do zigoto, dá-se início a uma série de divisões mitóticas, chamadas de clivagem, que fazem com que o zigoto, que possui uma célula de grande volume, se dividia em células nucleadas de menor tamanho, até a formação do blastocisto (GONÇALVES et al., 2002).

No terceiro dia de cultivo (D3), espera-se encontrar embriões de 2, 4 ou 8 células. Nesse estágio também ocorre o primeiro *feeding*, que consiste na renovação do meio de cultivo, para que este seja capaz de nutrir corretamente o

embrião. No D5, isto é, 48 horas após o processo supracitado, ocorre o segundo *feeding*, no D6 avalia-se o desenvolvimento embrionário (Tabela 3) e no D7, os embriões são envazados, ou para serem transferidos a fresco ou criopreservados (GONÇALVES et al., 2002; LOIOLA et al., 2014; DE SOUZA e ABADE, 2019).

Tabela 3. Classificação da morfologia embrionária.

Estádio	Morfologia
MO	Blastômeros evidentes, porém, não é possível determinar número exato. Massa de células ocupa maior parte do espaço dentro da ZP. Início do processo de compactação.
MOC	Compactação torna a massa de células coesa, há retração do embrião em relação à ZP, espaço perivitelínico aumentado.
Bi	Ocorre atração de água para o espaço intercelular, formando a blastocele. Formação de duas populações celulares distintas: o trofoblasto, que reveste a blastocele, e a massa celular interna (MCI), lateral à blastocele.
BL	Blastocele aumenta de tamanho, proporcionalmente maior que a MCI, ocupando gradualmente todo o espaço perivitelínico. Trofoblasto sofre diferenciações morfológicas e funcionais associadas à captação de nutrientes, enquanto as células da MCI mantêm potencialidade.
BX	Expansão da blastocele causa aumento de tamanho do embrião e progressiva redução na espessura da ZP.
BN	Embrião no processo de eclosão, zona pelúcida desprendida.
BE	Rompimento da ZP caracteriza a eclosão, com o embrião entrando em contato direto com os tecidos maternos.

MO: Mórula; MOC: mórula compactada; Bi: Blastocisto inicial; BL: Blastocisto; BX: Blastocisto expandido; BN: Blastocisto em eclosão; BE: Blastocisto eclodido. **FONTE:** VIANA, 2009.

2.2.6. Envase e criopreservação dos embriões

Após a classificação do estágio embrionário, os embriões devem ser envasados, em palhetas semelhantes às de inseminação artificial, individualmente. Para embriões que serão transferidos a fresco, o embrião deve estar centralizado na palheta, separado com duas colunas de ar, isolando as extremidades do lacre e do êmbolo (BALL e PETERS, 2006). Além disso, para que permaneçam viáveis, devem ser estocados em transportadoras adequadas com temperatura controlada, em torno de 37°C e sem incidência de luz direta (BRANDÃO et al., 2019).

O objetivo da criopreservação de embriões é preservar o metabolismo da célula em estado de quiescência, ou seja, parada da atividade enzimática, do metabolismo e da respiração celular, possibilitando que este seja reestabelecido após período de estocagem, para continuar seu desenvolvimento normal (DALCIN e LUCCI, 2010). A qualidade dos blastocistos interfere no sucesso da técnica de criopreservação, após o congelamento os embriões sofrem alterações estruturais leves (DIESEL et al., 2018). Existem duas técnicas para criopreservação dos embriões, a vitrificação e a congelação clássica, suas principais diferenças são a curva de congelação e a concentração crioprotetores utilizada (VAJTA; KUWAYAMA, 2006).

No congelamento clássico, a vantagem é o uso de baixas concentrações de crioprotetores, porém, nesse caso ocorre formação de cristais de gelo, que podem causar lesões às membranas e organelas do embrião (DODE et al., 2013).

Na vitrificação, são utilizadas altas concentrações de crioprotetores, possibilitando que, durante o resfriamento, as partículas de água se solidifiquem em estado vítreo, desta maneira não há formação de cristais de gelos. Porém, a desvantagem do uso dessa técnica, está associada à toxicidade dos crioprotetores, sendo assim, as células só podem ser expostas a essa solução por um período muito curto de tempo e/ou um volume mínimo de solução (GONÇALVES et al., 2002).

Para que a vitrificação seja viável, deve-se criar um sistema para minimizar perdas, principalmente pelos efeitos nocivos dos crioprotetores. Segundo Kuwayama (2007), as estatísticas de desenvolvimento embrionário mostram que os efeitos cumulativos tóxicos e osmóticos da vitrificação não diferem daqueles causados pela congelação lenta.

Dentre os protocolos de vitrificação, há o método de OPS (Open Pulled Straw, do inglês palheta aberta estirada) como suporte para envase dos embriões, o qual possui metade do diâmetro da palheta comum (0,25mL; Dias, 2017).

Segundo Fonseca et al. (2018), para o congelamento clássico, a palheta deve seguir a seguinte ordem (Figura 15a): o embrião deve estar na parte central da palheta, onde contém crioprotetor, no qual é separado por bolhas de ar do restante da palheta, que contém PBS com 20% de SFB e o protocolo de congelamento deve respeitar a seguinte curva (Figura 15b): de 20°C a -6°C em taxa de resfriamento de 3°C por minuto, estabilização durante 15 minutos, seeding (indução da formação de cristais de gelo após) 5 minutos, de -6°C a -32°C a 0,6°C por minuto e, finalmente, mergulhada em nitrogênio líquido.

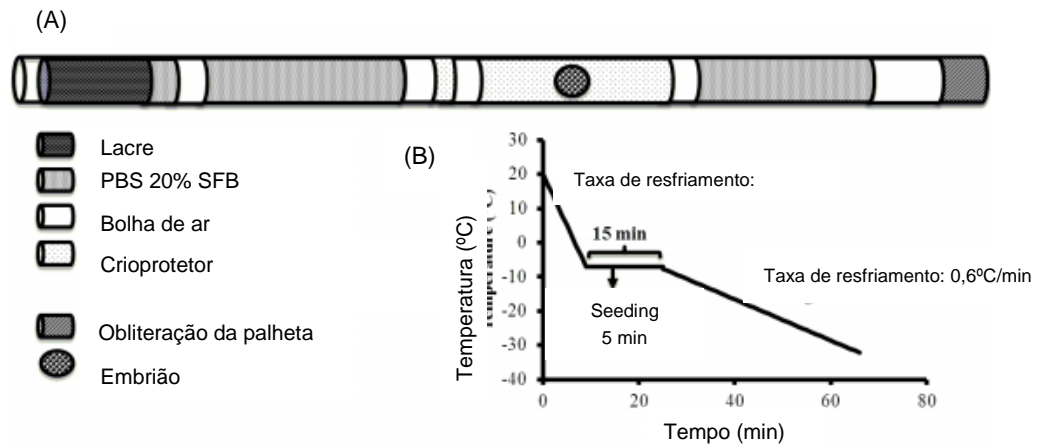


Figura 65. (A) Esquema ilustrativo de envase de palheta de embrião criopreservado. (B) Protocolo de congelamento lento. **FONTE:** Adaptado de FONSECA et al, 2018.

3. Relato de caso

Foram disponibilizados dados de 25 aspirações foliculares e fertilização *in vitro* que ocorreram durante o estágio curricular na empresa Embriovita, nos meses de outubro a dezembro de 2020. Foram colhidos 5.065 oócitos viáveis de 295 doadoras (média de 17,2 oócitos viáveis/ doadora), resultando em um total de 1.140 embriões, ou seja, taxa de blastocistos em média de 22,5% (Tabela 4).

Tabela 4. Relatório de produção de oócitos e embriões.

DATA OPU	CLIENTE	DOAD.	VIÁV.	EMB.	%EMB.	VIT.
15/10/2020	1	29	389	161	41,4	96
15/10/2020	2	3	17	8	47,1	8
16/10/2020	3	18	283	71	25,1	0
19/10/2020	4	12	338	31	9,2	0
19/10/2020	5	20	427	107	25,1	0
21/10/2020	6	15	159	22	13,8	0
22/10/2020	7	9	254	37	14,6	0
22/10/2020	8	7	168	30	17,9	0
22/10/2020	9	3	154	30	19,5	10
23/10/2020	10	9	238	34	14,3	34
26/10/2020	11	6	307	58	18,9	0
27/10/2020	12	11	138	18	13,0	0
27/10/2020	13	30	379	87	23,0	0
28/10/2020	14	18	147	24	16,3	24
28/10/2020	15	27	308	60	19,5	30
29/10/2020	16	30	422	99	23,5	0
29/10/2020	17	5	95	23	24,2	0
02/11/2020	18	23	478	147	30,8	45
03/11/2020	19	2	57	24	42,1	1
05/11/2020	20	1	8	0	0	0
05/11/2020	21	2	23	9	39,1	6
05/11/2020	22	7	57	14	24,6	14
05/11/2020	23	1	12	5	41,7	3
05/11/2020	24	1	23	6	26,1	6
06/11/2020	25	6	184	35	19,0	0
Total		295	5065	1140	22,5	277

OPU: ovum pick up (aspiração folicular); DOAD.: número doadoras de oócitos; VIÁV.: quantidade de oócitos viáveis; EMB.: quantidade de embriões produzidos; %EMB.; porcentagem de embriões produzidos; VIT.: total de embriões vitrificados. **FONTE:** Embriovita Reprodução Animal, 2020.

Os embriões eram avaliados segundo a morfologia embrionária (blastocisto inicial: BI, blastocisto: BL, blastocisto expandido: BX, blastocisto expandindo: BN ou blastocisto expandido: BE) e eram envasados para serem transferidos a fresco ou vitrificados pelo método de OPS (apenas BX passavam pelo processo de vitrificação). Neste caso, 24,2% dos embriões produzidos

foram vitrificados, permitindo que os embriões fossem transferidos posteriormente e não necessariamente no mesmo momento.

Do total de embriões produzidos neste período, 762 foram efetivamente transferidos. No diagnóstico de gestação aos 30 dias, foram confirmadas 276 gestações, ou seja, porcentagem de 36,2%. Aos 60 dias de gestação, além da confirmação da prenhez, também foi feita a sexagem fetal. O total de prenhezes neste período foi de 193, ou seja, 25,3%, dos quais, aproximadamente, 30% foram machos e 70% foram fêmeas (Tabela 5).

Tabela 5. Dados de transferência de embriões, porcentagens de prenhez, sexagem e mortalidade embrionária.

Nº	TE.	P30	%P30	P60	%P60	M	F	MORT	% MORT
1	75	22	29,3	16	21,3		16	6	27,2
2	42	21	50,0	14	33,3	1	13	7	33,3
3	31	6	19,3	4	12,9		4	2	33,3
4	105	28	26,6	19	18	13	6	9	32,1
5	22	9	40,9	7	31,8	3	4	2	22,2
6	36	12	33,3	9	25	1	8	3	25,0
7	28	6	21,4	4	14,2	3	1	2	33,3
8	13	5	38,4	4	30,7		4	1	20,0
9	53	24	45,2	18	33,9	14	4	6	25,0
10	18	7	38,9	6	33,3		6	1	14,2
11	83	28	33,7	21	25,3	12	9	7	25,0
12	73	25	34,2	20	27,3		20	5	20,0
13	22	12	54,5	7	31,8		7	5	41,6
14	115	53	46,0	33	28,9	13	20	20	37,7
15	9	3	33,3	1	11,1		1	2	66,6
16	5	2	40,0	1	20		1	1	50,0
17	6	3	50,0	2	33,3		2	1	66,6
18	26	10	38,4	7	26,9		7	3	30,0
Total	762	276	36,2	193	25,3	60	136	83	30,0

TE: embriões transferidos; P30: prenhezes com 30 dias; %P30: porcentagem de prenhezes confirmadas com 30 dias; P60: prenhezes com 60 dias; %P60: porcentagem de prenhezes confirmadas com 60 dias; M: machos; F: fêmeas; MORT: número de mortalidade embrionária; %MORT: porcentagem de mortalidade embrionária. **FONTE:** Embriovita Reprodução Animal, 2020.

4. Discussão

Em média, 30% dos oócitos submetidos à maturação *in vitro* chegam ao estágio de blastocisto, entretanto, há uma grande variação dos resultados (de 5 a 60%), isso se dá devido a diversos fatores, como o sêmen, qualidade e capacitação do oócito, habilidade do técnico, meios de cultivo, precisão dos equipamentos, entre outros (GONÇALVES et al., 2002). É sabido também que existe diferença entre a fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas em relação ao recrutamento folicular e produção de oócitos. Além disso, o manejo, nutrição, categoria, idade, condição corporal e ambiental dos animais também influenciam a produção de oócitos e, conseqüentemente, a produção embrionária (BARUSELI et al., 2007; VIANA e BOLS, 2005). Entretanto, neste relato, não houve separação dos animais por raça ou categoria.

As taxas de conversão oócito: embrião encontradas neste relato estão muito próximas às encontradas na literatura, com variação de 25 a 40%, segundo Bavister et al. (1992) e Lonergan et al. (2001).

As taxas de gestação de embriões produzidos *in vitro* ainda são muito variáveis, pois dependem além do estágio de desenvolvimento e qualidade do embrião, do tempo de transporte do embrião e de inovulação, além do estado nutricional dos animais que está intimamente ligado ao status reprodutivo (VARAGO et al., 2008; BECHER et al., 2018).

As taxas de gestação encontradas neste relato corroboram com a literatura. Segundo Borges Filho (2018), a taxa de gestação aos 30 e 70 dias, de embriões transferidos a fresco foi de 32 e 29%, respectivamente, e para

embriões vitrificados foi de 20%, tanto em 30 como em 70 dias. Já Garcia et al. (2004), encontraram taxas de gestação aos 60 dias que variaram de 20 a 60%.

A sexagem fetal é realizada por ultrassonografia juntamente com o diagnóstico de prenhez aos 60 dias, determinando a localização do tubérculo genital, o qual, encontra-se em direção à cauda nas fêmeas e ao cordão umbilical nos machos (GREGORY et al., 1995). Neste relato, o número de gestações de fêmeas foi maior que machos, pois a maioria dos procedimentos de PIVE foram feitos com sêmen sexado de fêmeas.

Por fim, as perdas gestacionais também são comuns e ocorrem por diversos fatores, como impasses no próprio embrião, ambiente uterino e a ocorrência de problemas de sinalização materno-fetal (LIMA e SOUZA, 2009). As perdas, ocorrem em sua maioria, durante os estádios de oito para 16 células (ativação do genoma do embrião) e pós-transferência, em torno dos dias 14 e 15 da gestação (SANTOS, 2010).

As taxas encontradas, em média, podem ser consideradas altas quando comparadas aos trabalhos de Scanavez et al. (2013), que encontraram 13,8% e 9,1% de perdas embrionárias para embriões frescos $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$ Girolando, respectivamente, e de Baruseli et al. (2011), que encontraram percentual de perdas de 23,1% entre os meses de primavera e verão.

No presente relato, pode-se relacionar boa parte à influência negativa do clima (verão), pois altas temperaturas causam estresse térmico nas fêmeas, que levam à insuficiência da reprodução. Além da diminuição da qualidade dos oócitos e, conseqüentemente, da qualidade do embrião, pode levar à formação de CL menos capaz de manter a gestação e pode promover mudanças no

ambiente uterino, o que pode resultar nas perdas embrionárias (HANSEN, 2002; LOONEY et al., 2016).

5. Considerações Finais

A técnica de produção *in vitro* de embriões tem como principal benefício a difusão de material genético materno. Entretanto, no presente relato pode-se verificar grande variação de resultados, devido à heterogeneidade dos rebanhos atendidos, observando-se melhores resultados na conversão de embriões e prenhez, em geral, em rebanhos mais bem manejados.

Para isso, a assistência veterinária é extremamente necessária para indicar ao produtor mudanças que podem ser feitas para melhoria dos índices reprodutivos. Apesar de diversos aspectos influenciarem a técnica, esta é uma das responsáveis pelo grande avanço genético do rebanho nacional nos últimos anos.

Referências Bibliográficas

ANDREOTI, M. Produção in vitro de embriões bovinos: uso da glutatona durante o processo de lavagem e capacitação espermática, 2007.

AVELINO, K.B. et al. In vitro production of embryos of cows with acquired infertility. *Theriogenology*, v.57, p.656, 2002.

BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. Reprodução em Bovinos. 3. ed. São Paulo: Roca, p.232, 2006

BARUSELLI P.S., et al. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*, v.76, p.1583- 1589, 2011

BARUSELLI, P.S. et al. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, n. 2, p. 205-211, 2007.

BAVISTER B.D., et al. Development of in vitro mature/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, v.37, p.127-146, 1992.

BECHER, B.G. et al. Fatores que afetam a produção in vitro de embriões (PIVEe) em bovinos. *Enciclopédia biosfera*, v. 15, n. 28, 2018.

BORGES FILHO, G.N. Taxa de concepção e gestação de embriões produzidos in vitro, transferidos a fresco ou criopreservado, em vacas e novilhas nelore. 2018.

BRANDÃO, G.V.R. et al. Revisão de Literatura: Transferência de Embriões em Bovinos. 2019.

BUENO A.P, BELTRAN M.P. Produção in vitro de embriões bovinos. Rev Elet Med Vet, n.11, p.1-7, 2008.

CAMPELO, I.S. et al. Avaliação da maturação nuclear de oócitos bovinos submetidos a três diferentes sistemas de incubação. R. bras. Reprod. Anim., p. 215-216, 2016.

CARNEIRO, I.M.B. et al. Oócitos bovinos: influência das estações do ano e maturação in vitro em meio enriquecido com quercetina. MAGISTRA, v. 30, p. 134-142, 2019.

CAVALIERI, F.L.B. et al. Estudo sobre o cultivo in vitro de embriões bovinos durante o transporte. Ars Veterinaria, v. 31, n. 1, p. 07-11, 2015.

DALCIN, L.; LUCCI, C. M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. Revista Brasileira de Reprodução Animal Belo Horizonte, p. 149-159, 2010.

DE SOUZA, N.S.; 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, 2019.

DIAS, A.J.B. Criopreservação de ovócitos e embriões bovinos. FAGROPEC-Facultad de Ciencias Agropecuarias, v. 9, n. 2, p. 57-61, 2017.

DIESEL, T.O. et al. Delipidação química na produção in vitro e criopreservação de embriões bovinos. 2018.

DODE, M.A.N. et al. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2013.

FABER, D. C.; et al. Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology*.v. 59, p. 125- 138, 2003.

FAO. 2019. Meat Market Review, March 2019. Rome.

FERREIRA, E.M., et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 71:836-48. 2009.

FONSECA, J. F. et al. Freezing goat embryos at different developmental stages and quality using ethylene glycol and a slow cooling rate. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 70, n. 5, p. 1489-1496, 2018.

GALLI, C. et al. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, v. 59, n. 2, p. 599-616, 2003.

GARCIA, J. M et al. Estado da arte da fertilização in Vitro em bovinos. In: *Annals of the First International Symposium on Animal Reproduction Applied*: 14-16; Londrina. p. 223-230, 2004.

GILCHRIST, R. B. et al. Oocyte-secreted factors:regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*, [s.l.], v.14, p.159-177, 2008.

GONÇALVES, B. D. et al. *Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal*. São Paulo: Varela, 2002.

GOUVEIA, F. F. A produção in vitro de embriões bovinos. 2011.

GREGORY, R. M. et al. Sexagem dos fetos bovinos através da ultra-sonografia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. p. 412, 1995.

GUEMRA, S. et al. Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 65, n. 6, p. 1616-1624, 2013.

GULART, L. V. M. Meios de cultivo para maturação de oócitos e produção de embriões avaliados por marcadores moleculares. 2015.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Reproduction in farm animals, 509p, 2000.

HANSEN, P.J. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. Journal of Animal Science, v.80, n.2, p.33-44, 2002.

HARDY, K., et al. In vitro maturation of oocytes. BrMed Bull, v.56, p.588-602, 2000.

HONORATO, M. T. et al. Importância da escolha de receptoras em um programa de transferência de embriões em bovinos. PUBVET, 7, 1870-1980, 2013.

HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. Theriogenology, v. 59, n. 2, p. 675-685, 2003.

IETS. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. Embryo Transfer Newsletter, v. 32, p. 14-26, 2014.

KOCH, J. et al. Produção in vitro de embriões bovinos através de técnicas de micromanipulação. 2017.

KUWAYAMA M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the cryotop method. *Theriogenology*, v.67, p.73-80, 2007.

LANDIM-ALVARENGA, F.C. Manejo do neonato. In: PRESTES, N.C., LANDIMALVARENGA, F.C., (Eds). *Obstetrícia veterinária*. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, p.158-77, 2006.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *J. Anim. Sci.*, v.48, p.76-86, 1979.

LIMA, J. M. P. et al. Progresso metodológico e sua influência na produção in vitro de embriões bovinos no Brasil. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 38, n. 3, p. 135-140, 2014.

LIMA, I. M. T.; SOUZA, A. L. Desenvolvimento e sobrevivência de embriões no período de pré-implantação: enfoque em ruminantes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, V.33, p.194-202, 2009.

LOIOLA, M. V. G. et al. Validação de um programa de produção in vitro de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. *Ciênc. anim. bras.*, Goiânia, v. 15, n. 1, p. 93-101, 2014.

LONERGAN P., et al. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod Nutr Dev*, v.41, p.427-437, 2001.

LOONEY, C.R.; et al. Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology*, v.65, p.201-209, 2016.

LUEDKE, F. E. Aspectos técnicos da produção in vitro de embriões bovinos-revisão. 2018.

MARTINS, C. F. et al. Atlas de morfologia espermática bovina. EMBRAPA, 2016.

MELLO, R. R. C. et al. Produção in vitro (PIVE) de embriões em bovinos. *R. bras. Reprod. Anim.*, p. 6458-6458, 2016.

MEINTJES, M. et al. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for in vitro fertilization. *Journal of animal science*, v. 73, n. 4, p. 967-974, 1995.

OLIVEIRA, C. S et al. 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. Embrapa Gado de Leite-Documentos (INFOTECA-E), 2014.

ORISAKA, M. et al. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular Development. *Journal of Ovarian Research* 2:9-15. 2009.

PALMA, G. A. Producción in vitro de embriones bovinos. *Biotecnología de la Reproducción*. Buenos Aires: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), p. 225-294, 2001.

PENARIOL, L. B. C. et al. Influência dos métodos de seleção espermática (swim-up, gradiente de Percoll® e washing), na Fertilização in vitro, associado a dinâmica do desenvolvimento embrionário em bovinos. 2017.

REICHENBACH, H. et al. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal, cap.8, p.127-177. São Paulo: Varela, 2002.

SANGILD, P. T. et al. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro-produced bovine embryos. *Biology of reproduction*, v. 62, n. 6, p. 1495-1504, 2000.

SANTOS, K. J. G. et al. Efeito da progesterona exógena na produção de embriões em novilhas leiteiras. 2010.

SCANAVEZ, A. L et al. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, n. 3, p. 722-728, 2013.

SIRARD, M.A. The influence of in vitro fertilization and embryo culture on the embryo epigenetic constituents and the possible consequences in the bovine model. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 411–417, 2017.

TANEJA, M. et al. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biology of reproduction*, v. 62, n. 1, p. 206-213, 2000.

TETZNER, T. A. D. Efeitos da substituição do soro fetal bovino (SFB) e da albumina sérica bovina (BSA) pela ovalbumina (OVA) na produção in vitro de embriões bovinos. 2007.

TRIPATHI, A. et al. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocyte. *J Cell Physiol* 223:592-600. 2010.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, v. 65, n. 1, p. 236-244, 2006.

VARAGO, F. C et al. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.

VIANA J.H.M. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more in vitro-produced than in vivo-derived embryos were transferred worldwide. *Embryo Transfer Newsl*, v.36(4), p.8-25, 2018.

VIANA, J. H. M. Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo. *Embrapa Gado de Leite-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*, 2009.

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