



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CÂMPUS DE ARAGUAÍNA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ALINY SILVA SOUZA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:
Produção in vitro de embriões bovinos

Araguaína/TO
2021

ALINY SILVA SOUZA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:
Produção *in vitro* de embriões bovinos

Monografia foi avaliada e apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína, Curso de Medicina Veterinária para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Kelen Felipe Lima

Araguaína/TO
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

S729r Souza, Aliny Silva.

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:
Produção in vitro de embriões bovinos. / Aliny Silva Souza. – Araguaína,
TO, 2021.

40 f.

Relatório de Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus
Universitário de Araguaína - Curso de Medicina Veterinária, 2021.

Orientadora : Ana Kelen Felipe Lima

1. Biotecnologia. 2. Maturação. 3. Oócitos. 4. OPU. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

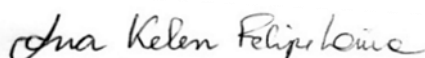
ALINY SILVA SOUZA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:
Produção *in vitro* de embriões bovinos

Monografia foi avaliada e apresentada à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína, Curso de Medicina Veterinária para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 19 / 04 / 2021

Banca Examinadora



Prof^ª Dra. Ana Kelen Felipe Lima, UFT

Prof^ª. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias, UFT

Msc. Samara Dias Cardoso Rodrigues, UFT

Araguaína, 2021

Dedico este trabalho à minha família, especialmente ao meus pais, Aduino e Zélia, por tamanho amor, apoio e esforços para que eu chegasse até aqui. E a todos os amigos e profissionais que me acompanharam durante essa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à DEUS, pela benção da vida e por iluminar meu caminho até aqui, dando força, coragem, sustento em dias difíceis e esperança de dias melhores.

Aos meus pais, Adauto e Zélia, amores da minha vida, por acreditarem em mim, por todo cuidado, amor e renúncias, para que esta conquista pudesse ser possível. Todos os dias me inspiro em vocês, meus maiores exemplos de humildade, compaixão e resiliência. Agradeço aos meus irmãos, Fernando, Fabrício e Marianny, por sempre se fazerem presentes apesar da distância, amo cada um de vocês.

Às minhas amigas, Helen Quézia e Bianka que me acolheram no início dessa jornada, abrindo as portas de sua morada. Gratidão por todos os momentos compartilhados, aprendizados e acima de tudo pela amizade.

À Isabela, Julia e Jonas, amigos especiais e fundamentais ao longo desses anos, obrigada por serem vocês, amo nossa parceria. Às Meninas Boas (Adha Gabriela, Adriana, Luana, Maria Amanda, Valéria, Ana Cristina) e ao saudoso Madagascar (Douglas, Elison, Murilo, Vinícius) por todas as aventuras, risadas, compartilhando momentos bons e ruins. Vocês tornaram essa trajetória muito mais leve e especial. Aos meus colegas de turma pelo companheirismo e ótimas histórias durante esse período.

À minha orientadora Ana Kelen, amiga e mestre que me guiou divinamente ao longo da graduação, por ser clareza em meio as minhas dúvidas, incentivo diante das inseguranças e amizade dentro e fora da universidade. Aos demais professores por todos os conhecimentos transmitidos, pelo empenho em formar bons profissionais e acima de tudo, em formar boas pessoas. Aprendemos muito com cada um de vocês, muito obrigada!

À todos os excelentes profissionais que tive a honra de estagiar, Prof Márcio Gianordoli, Magno Reis, Márcio Guimarães, Moacir, Aurélio Ricardo (José Carlos), Gibson Insfran e Yan Lacerda (Silvio), por essa vivência tão essencial em minha formação. Tornaram a experiência no campo gratificante e enriquecedora, despertando em mim força, coragem e superação. Gratidão.

Ao grupo Geran, bons amigos unidos pelo fascínio pela reprodução animal, por todo apoio e colaboração, mostrando o valor do trabalho em equipe. Ao GOL filhos de Deus, por ser apoio espiritual dentro da universidade, fortalecendo a fé e o amor, além de permitir conhecer pessoas maravilhosas.

À equipe do Laboratório Embrião da ABS Pecplan, pela oportunidade gratificante do estágio. Obrigada por me acolherem tão bem, por todo aprendizado, pela amizade e boas histórias, sempre tão atenciosos e dispostos a ensinar. Vocês são incríveis!

RESUMO

O Estágio Curricular Obrigatório Supervisionado foi realizado no Laboratório Embrião (In Vitro Brasil) da empresa ABS Pecplan em Uberaba/Delta, Minas Gerais. O mesmo ocorreu no período de 19 de Janeiro a 26 de Março de 2021, totalizando 392 horas, sob a orientação da Prof^a Dr^a Ana Kelen Felipe Lima e supervisão da Médica Veterinária Luísa Anastácia Santos de Oliveira. A área de interesse foi a reprodução animal com ênfase na biotecnologia reprodutiva bovina de produção *in vitro* de embriões (PIVE). As atividades desempenhadas compreenderam o processo de produção *in vitro* de embriões bovinos, acompanhando desde a recepção dos oócitos até a saída dos embriões à campo, além de procedimentos de otimização da rotina laboratorial com o preparo de materiais. Assim, este trabalho tem como objetivo descrever o local de estágio, assim como as atividades desenvolvidas ao longo deste período discutindo tecnicamente a metodologia empregada pela empresa para a produção de embriões *in vitro* baseando-se na literatura existente sobre o tema.

Palavras-chaves: Biotecnologia. Maturação. Oócitos. OPU.

ABSTRACT

The Obligatory Curricular Training Supervised was carried out at the Embryo Laboratory (In Vitro Brasil) of the company ABS Pecplan in Uberaba / Delta, Minas Gerais. The same occurred in the period from January 19 to March 26, 2021, totaling 392 hours, under the guidance of Prof. Dr. Ana Kelen Felipe Lima and supervision of Veterinary Physician Luísa Anastácia Santos de Oliveira. The area of interest was animal reproduction with an emphasis on bovine reproductive biotechnology for in vitro embryo production (PIVE). The activities performed included the process of in vitro production of bovine embryos, following from the reception of the oocytes until the departure of the embryos to the field, in addition to procedures to optimize the laboratory routine with the preparation of materials. Thus, this work aims to describe the place of internship, as well as the activities developed over this period, technically discussing the methodology used by the company for the production of embryos in vitro based on the existing literature on the subject.

Key-words: Biotechnology. Maturation. Oocytes. OPU.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – A: Laboratório principal PIVE 1. B: Laboratório de congelamento lento PIVE 3.....	15
Figura 2 – Cronograma diário da produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos do Laboratório Embrião.....	17
Figura 3 – A: Tubo de maturação pronto. B: Oócitos maturados.....	21
Figura 4 – Preparação de plaquinhas de petri para FIV.....	22
Figura 5 – A: Deposição do sêmen em eppendorf sob gradiente descontínuo de Percoll. B: Fertilização dos oócitos.....	24
Figura 6 – A: Oócitos fecundados 24h após a FIV. B: Lavagem e desnude dos oócitos fecundados.....	26
Figura 7 – Zigotos clivados e não clivados com 4 dias de desenvolvimento.....	27
Figura 8 – A: Blastocistos expandidos e em eclosão com sete dias de desenvolvimento. B: Envase à fresco de embriões.....	28
Figura 9 – Dispositivo de vitrificação <i>open pulled straw</i> (OPS).....	29
Figura 10 – A: Materiais usados para vitrificação. B: Conferência de OPSs antes do armazenamento.....	31
Figura 11 – Envase de embriões para congelamento lento/DT.....	33
Figura 12 – A: Palhetas após envase com marcações da área do seeding prontas para congelamento. B: Seeding.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividades acompanhadas e desenvolvidas durante o Estágio Curricular Supervisionado Obrigatório realizado no Laboratório Embrião (IVB) da empresa ABS Pecplan em Uberaba/Delta, Minas Gerais, no período de 19 de Janeiro a 26 de Março de 2021	18
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIV – Cultivo *in vitro*

COC – Complexo cúmulus oócito (*Cumulus Oocyte Complexes*)

CPs – Crioprotetores

D0 – Dia zero

D-1 – Dia menos um

D1 – Dia um

D4 – Dia quatro

D6 – Dia seis

D7 – Dia sete

DPBS – *Dulbecco's phosphate-buffered saline*

DT – Transferência direta (*Direct transfer*)

FIV – Fertilização *in vitro*

HE – Heparina

IVB – In Vitro Brasil

MIV – Maturação *in vitro*

OPS – Palheta puxada aberta (*Open Pulled Straw*)

OPU – Aspiração folicular (*Ovum pick up*)

PHE – Penicilamina-Hipotaurina-Epinefrina

PIVE – Produção *in vitro* de embriões

rpm – Rotações por minuto

SOF – Fluido sintético do oviduto (*Synthetic Oviductal Fluid*)

TCM 199 – Meio de Cultivo Tecidual 199 (*Tissue Culture Medium 199*)

UFT – Universidade Federal do Tocantins

LISTA DE SÍMBOLOS

μl	Microlitros
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	15
3	ATIVIDADES ACOMPANHADAS E DESENVOLVIDAS.....	17
3.1	Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	18
3.1.1	Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	20
3.1.2	Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	21
3.1.3	Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	24
3.1.4	Clivagem (CLIV).....	26
3.1.5	Previsão de envase.....	27
3.1.6	Embrião à fresco.....	28
3.1.7	Embrião Vitricado	29
3.1.7.1	<i>Desvitrificação</i>	31
3.1.8	Embrião <i>Direct Transfer</i> (DT).....	31
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
	REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

O Estágio Curricular Supervisionado Obrigatório do curso de Medicina Veterinária foi realizado no Laboratório Embrião (In Vitro Brasil - IVB) da empresa ABS Pecplan, sediada em Uberaba/Delta, Minas Gerais. Ocorreu no período de 19 de janeiro a 26 de março de 2021, totalizando 392 horas, sob a orientação da Prof^ª. Dr^ª. Ana Kelen Felipe Lima e supervisão da Médica Veterinária Luisa Anastásia Santos de Oliveira e demais técnicos do laboratório.

O propósito do estágio curricular é promover a empregabilidade dos conhecimentos previamente adquiridos ao longo da graduação, inerente ao desenvolvimento do lado técnico-profissional dos acadêmicos. A área de interesse foi a reprodução animal com ênfase na biotecnologia reprodutiva bovina de produção *in vitro* de embriões (PIVE).

A produção de embriões é uma biotécnica reprodutiva que vem se consolidando como ferramenta de melhoramento genético, obtendo de forma rápida e fácil a incorporação de características desejáveis nos rebanhos (LUEDKE *et al.*, 2019). A ABS Pecplan é a maior empresa nesse segmento, com oito laboratórios próprios e 27 filiados que utilizam a tecnologia IVB, tanto no Brasil com no exterior. Em 2020, bateu diversos recordes de produção global de embriões, atingindo a marca de 81 mil unidades só em novembro (ABS News, 2021).

A escolha da área e local do estágio se baseou em vista do mercado promissor desta biotécnica bem como pela competência tecnológica e produtiva apresentada pela empresa ABS Pecplan em proporcionar compreensão da dinâmica de um laboratório comercial de produção de embriões. As atividades desenvolvidas compreenderam o processo de produção *in vitro* de embriões bovinos, acompanhando desde a recepção dos oócitos até a saída dos embriões à campo, além de procedimentos de otimização da rotina laboratorial com o preparo de materiais.

Logo, ao decorrer deste relatório será descrita as atividades desenvolvidas durante o estágio em laboratório de PIVE bovina, discutindo tecnicamente a metodologia empregada pela empresa baseando-se na literatura existente sobre o tema.

2 CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O estágio foi realizado no Laboratório Embrião (IVB) da empresa ABS Pecplan, localizada na rodovia 050, km 196, no município Delta-MG. A ABS Pecplan é uma multinacional líder no segmento de biotecnologias reprodutivas, fornecendo serviços reprodutivos, produtos e genética de qualidade aos seus clientes. Em sua sede em Minas Gerais, abriga a central de touros, o Laboratório IntelliGen – desenvolvedor da inovadora linha de sêmen sexado da ABS, a Sexcel®, e o Laboratório Embrião com tecnologia IVB. Em 2018, a ABS se tornou a única dona da In Vitro Brasil, com três laboratórios próprios em território nacional (Mogi Mirim-SP, Xinguara-PA e Uberaba-MG).

O laboratório Embrião de Uberaba conta com ampla estrutura, equipamentos modernos e equipe qualificada com 13 técnicos. No prédio do laboratório, ao entrar tem-se a recepção, banheiros e ao lado a sala de transição/área limpa, que dá acesso ao corredor interno. Este conta com um lavabo para higienização das mãos e integra os diferentes setores do laboratório, os quais são: o laboratório PIVE 1 – onde se concentram as atividades da rotina de PIVE, equipado com 10 incubadoras e 6 fluxos (Figura 1-A); o laboratório PIVE 2 – sala de treino ou auxiliar, que possui 3 incubadoras, 2 fluxos e 2 geladeiras com meios; e o laboratório PIVE 3 – destinado à realização do processo de congelamento lento dos embriões DT, munido com 2 incubadoras, 1 fluxo, 1 geladeira, 5 máquinas de congelamento de embriões e 5 botijões de nitrogênio (Figura 1-B).

Figura 1 - A: Laboratório principal PIVE 1. **B:** Laboratório de congelamento lento PIVE 3.

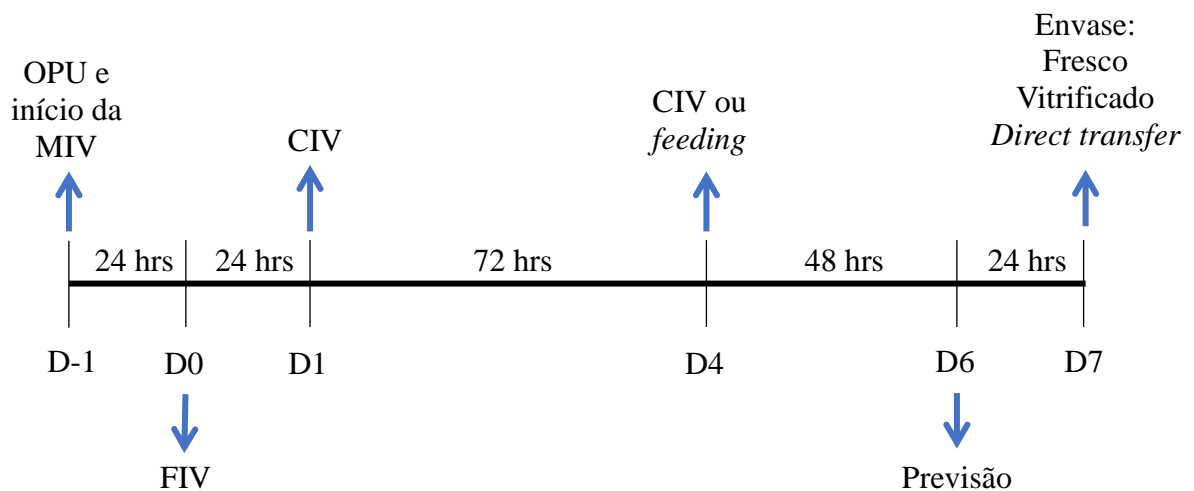


Seguindo o corredor, tem-se a sala de pesquisa e desenvolvimento – dotado de 2 fluxos, 3 incubadoras, 2 microscópios; a sala de estoque – armazena embriões e sêmen de clientes e parceiros e a sala de apoio ao laboratório – abriga sete computadores para elaboração das fichas e relatórios de produção. Com acesso externo, na área suja, tem-se a sala de esterilização e campo – local de preparação dos materiais utilizados na rotina e armazena/recepciona os equipamentos de campo, respectivamente, comunicando com a área limpa por meio de janelas; e anexo, uma sala de reuniões para os técnicos de campo.

3 ATIVIDADES ACOMPANHADAS/DESENVOLVIDAS

Ao decorrer do estágio pode-se acompanhar todas as etapas da PIVE, desde a recepção dos oócitos para a maturação *in vitro* (MIV), o preparo do sêmen e oócitos maturados para a fertilização *in vitro* (FIV), a passagem para os meios de cultivo *in vitro* (CIV) e clivagem (CLIV), a previsão e envase dos embriões, assim como a criopreservação por vitrificação e congelamento lento (*Direct Transfer – DT*). A entrada dos oócitos até a saída dos embriões, ocorriam no período de 9 dias, indo do dia menos um (D-1) até o dia sete (D7), respectivamente. O cronograma com a identificação dos procedimentos diários da PIVE está ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Cronograma diário da produção *in vitro* de embriões bovinos do Laboratório Embrião



Fonte: Autor, 2021.

Além disso, as atividades diárias baseavam-se em auxiliar na rotina do laboratório com a preparação, reposição e organização de materiais, anotação em fichas de produção, ajudas eventuais nos setores de esterilização e estoque. Na Tabela 1, verifica-se a carga horária referente a cada atividade.

Tabela 1 – Atividades acompanhadas e desenvolvidas durante o Estágio Curricular Supervisionado Obrigatório realizado no Laboratório Embrião (IVB) da empresa ABS Pecplan em Uberaba/Delta, Minas Gerais, no período de 19 de Janeiro a 26 de Março de 2021.

Atividades acompanhadas e desenvolvidas	Total de horas	%
Preparação, reposição de materiais e auxílio na rotina em geral	222	57
Cultivo <i>in vitro</i>	25	6,5
Fertilização <i>in vitro</i>	20	5
Clivagem ou <i>feeding</i>	25	6,5
Previsão	15	4
Envase à fresco	20	5
Criopreservação de embriões	65	16
Total	392	100

Fonte: Autor, 2021.

A seguir, uma descrição mais detalhada acerca do processo de produção dos embriões:

3.1 Produção *in vitro* de embriões

Nas últimas décadas, a pecuária brasileira teve significativos aumentos de produtividade de carcaça, saltando 80% de 1998 a 2018, oriundo da busca por eficiência reprodutiva e produtiva nos animais, melhorias de sanidade e nutrição (MALAFAIA, 2020). Nesse contexto, as biotecnologias reprodutivas avançam constantemente, visando acelerar o progresso genético nos rebanhos em curtos espaços de tempo, a exemplo da produção *in vitro* de embriões (PIVE) (DA SILVA *et al.*, 2015). Mundialmente, o Brasil se tornou referência técnico-científica na área, produzindo em larga escala e com ampla aplicação em todo território, refletindo na elevação da qualidade de seus animais (LUEDKE *et al.*, 2019).

A PIVE é uma técnica de reprodução assistida que promove a interação de oócito e espermatozoides fora do trato reprodutivo da fêmea bovina, gerando o zigoto, que será cultivado em laboratório até estágio apto para transferência na vaca receptora (MELLO *et al.*, 2016). Sua aplicação impacta diretamente no melhoramento genético animal por obter múltiplos embriões de fêmeas de alto valor genético, impossibilitadas ou não de conceber por meios convencionais, além de maximizar o rendimento de doses de sêmen, elevando a

intensidade e pressão de seleção ao passo que reduz o intervalo de gerações (LUEDKE *et al.*, 2019). Dentre as associações de biotécnicas reprodutivas, o sêmen sexado apresenta maior rendimento quando usado na FIV, permitindo a fertilização de vários oócitos de doadoras diferentes com uma única palheta de sêmen (DELL'AQUA, 2006).

A primeira etapa dos programas de PIVE é a obtenção dos oócitos de boa qualidade. Esta pode ser realizada por meio de laparotomia, laparoscopia, punção folicular ou *slicing* de ovários *post mortem* e aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia – *Ovum pick up* (OPU), a mais amplamente utilizada (SOUZA e ABADE, 2018). A OPU é um procedimento pouco traumático e invasivo, passível de ser realizado em fêmeas gestantes até o terceiro mês, recém-paridas e jovens a partir dos seis meses de idade, tornando-as doadoras de oócitos, visto que não demanda uso de hormônios para a recuperação oocitária, prolongando a vida reprodutiva desses animais (MELLO *et al.*, 2016).

Os oócitos recuperados para a PIVE são aspirados de folículos entre 2-8 mm, pois tamanhos inferiores ainda não apresentam competência para desenvolver e os superiores certamente já iniciaram a maturação ou se encontram em atresia (GONÇALVES *et al.*, 2008). Para a coleta na OPU, o técnico utiliza uma agulha aclopada a uma guia de aspiração, associado a um transdutor micro convexo, visualizando o ovário no ultrassom conforme punciona os folículos.

O sistema de aspiração é ligado a uma bomba de vácuo que conduz os oócitos até o recipiente de armazenagem com meio DPBS, heparina (HE) e soro fetal bovino (MARIANO *et al.*, 2015). O procedimento deve ser cuidadoso, prezando pela integridade das células do *cumulus*, como requisito de sucesso para as etapas subsequentes. O material aspirado é lavado, depositado em placas de petri e submetidos a contagem e avaliação da qualidade oocitária.

Segundo Lonergan (1992), os oócitos são classificados em graus quanto a presença de células do *cumulus* e características do ooplasma em: Grau I - oócitos com mais de três camadas de células compactas do *cumulus*, e citoplasma regular; Grau II - oócitos com uma a três camadas de células do *cumulus*, citoplasma regular ou apresentando granulações finas; Grau III - oócitos apresentando menos de três camadas do *cumulus* ou parcialmente desnudos, citoplasma irregular e Grau IV - desnudos (oócitos sem células do *cumulus*) ou em degeneração (com *cumulus* expandido e citoplasma heterogêneo apresentando granulações severas). No Laboratório ABS, apenas o grau I, II e II são considerados viáveis, embora os desnudos também sejam encaminhados para maturação *in vitro*.

3.1.1 Maturação *in vitro* (MIV)

A maturação compreende um conjunto de alterações nucleares e citoplasmáticas fundamentais para a plena competência do oócito em desenvolver fases embrionárias iniciais (WARD *et al.*, 2002). Nuclearmente a meiose é retomada, progredindo do estágio de prófase I ou vesícula germinativa para a metáfase II e citoplasmaticamente redistribuindo as organelas celulares, concentrando-se no centro da célula. *In vivo* esse mecanismo é desencadeado por picos pré-ovulatórios de hormônio luteinizante (LH) agindo apenas sob os folículos dominantes, culminando com a ovulação. Entretanto, quando *in vitro*, o ato de remover o complexo-cumulus-oócito do interior dos folículos na punção é suficiente para ativar automaticamente a maturação oocitária (SIRARD, 2001).

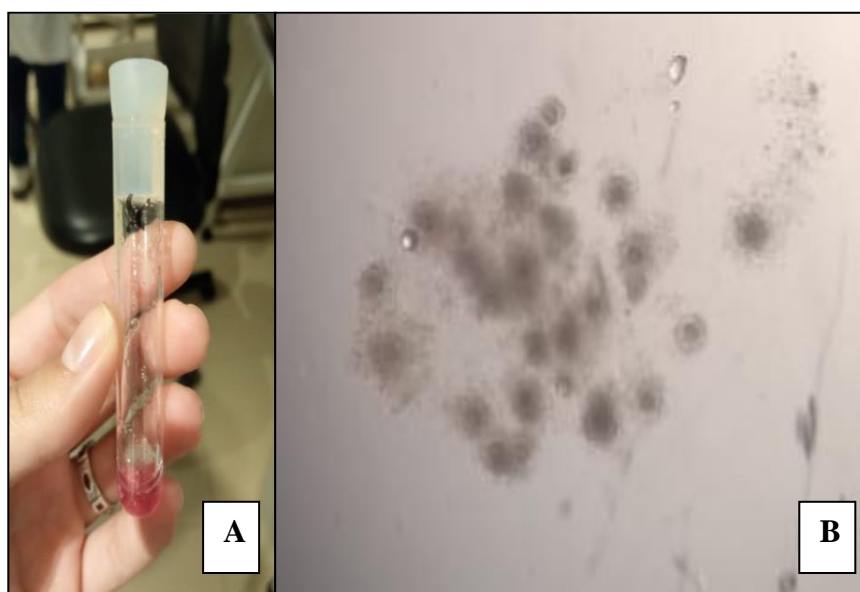
O período de maturação, denominado D -1 cessa com 24 h e antecede à FIV. Os meios para MIV devem se assemelhar em grande parte ao ambiente *in vivo*, seja em nutrientes, atmosfera e pH. Logo, o meio mais difundido entre os laboratórios é o TCM 199, que por não ser específico para este fim, recebe suplementações com LH, hormônio folículo estimulante (FSH), piruvato, antibióticos, fonte proteica e sistema tampão (GONÇALVES *et al.*, 2007; GOTTARDI e MINGOTI, 2009; CHAVES *et al.*, 2010). No entanto, a formulação é variável, cada empresa desenvolve seu próprio protocolo e na ABS, nenhum meio teve sua composição elucidada durante o estágio.

Os tubos de maturação são preparados no laboratório Embrião e levados à campo para que os técnicos armazenem os oócitos oriundos da OPU. Nos tubos são depositados o meio de maturação ABS, óleo mineral ABS, infundidos com mistura gasosa composta de 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂ por alguns segundos e vedados imediatamente com rolhas de silicone, como pode ser visto na Figura 3-A. Como o meio é dependente de gás, é necessário sempre incorporar nas garrafas originais antes de retornar à geladeira e novamente nos tubos antes de depositar os oócitos. O técnico de campo os recebe organizados em saquinhos plásticos juntamente com tubos (15 mL) com meio de lavagem ABS, em quantidade baseada no número de doadoras a serem aspiradas no dia.

Após a OPU, os oócitos são contados, classificados e alocados em agrupamentos de 50, 60 ou até 70 unidades por tubo, dado a limitação do meio em nutri-los. Caso a aspiração obtenha quantidades que excedem a capacidade de um tubo, são divididos equilibradamente em dois ou mais, sempre identificados com o número da vaca doadora. Os tubos contendo os oócitos seguem para o laboratório em transportadoras (WTA®, TED®) com temperatura controlada (+- 36,6°C). Ao chegar, são armazenados sem tampa nas incubadoras de MIV, em

atmosfera controlada à 38,5°C, 5 % CO₂ e umidade saturada, permanecendo até que se complete o período de maturação. Este é finalizado após 24 horas da OPU, quando o ócito finalmente está apto a ser fecundado pelo espermatozoide (Figura 3-B).

Figura 3 - A: Tubo de maturação pronto. **B:** Ócitos maturados.



Fonte: Arquivo pessoal

3.1.2 Fertilização *in vitro* (FIV)

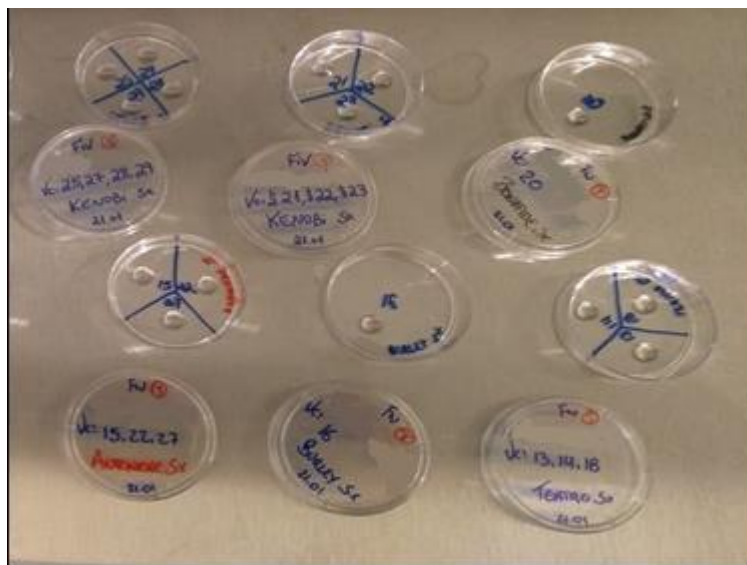
Na FIV, o ócito maturado é co-cultivado com espermatozoides, formando o zigoto (MELO *et al.*, 2016). Este configura o marco inicial, do desenvolvimento embrionário, chamada de dia zero (D0). É preconizado que se comece a FIV a partir do horário de aspiração das primeiras vacas a fim de não as atrasar, sendo preferível que se adiante as últimas. De posse da ficha de aspiração são coletados o número das doadoras, quantidade de ócitos por vaca e acasalamentos. Logo são calculadas as quantidades de meios necessários, número de gotas, doses de sêmen, elaboração de placas para fertilização e das fichas de produção.

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

As placas de petri, 35 mm são identificadas na tampa com o procedimento (FIV), nome do cliente, número das vacas e o touro a ser utilizado. Já o fundo das placas é dividido

em quadrantes de acordo com a quantidade gotas e doadoras, sendo que uma gota recebe até 35 oócitos (Figura 4). Para vacas que serão acasaladas com sêmen convencional, a gota será de meio FIV Pronto ABS, enquanto com sêmen sexado a gota será de meio FIV SEX ABS e ambas as placas são cobertas com óleo mineral ABS para estabilizar as gotas.

Figura 4 – Preparação de placas de petri para FIV.



Fonte: Arquivo pessoal

A FIV inicia-se com a preparação dos oócitos maturados concomitantemente com o preparo do sêmen. Em placa de petri de 90 mm é depositada uma gota de meio TL lavagem ABS e outra gota com meio FIV Pronto para cada doadora. Os oócitos então são retirados dos tubos de maturação e lavados nas duas gotas, respectivamente. Logo após são distribuídos nas gotas correspondentes nas placas de FIV, aguardando a fertilização. A quantidade de palhetas de sêmen requerida é calculada de acordo com o número de gotas por doadora, onde se tem: 1 dose de sêmen convencional/ até 8-10 gotas e meia dose/ até 3 gotas; 1 dose de sêmen sexado de macho/ até 5 gotas, sexado de fêmea/ até 6 gotas e meia dose de ambos/ até 2 gotas.

Para a fertilização é necessário que o sêmen passe por um processo de seleção, aumentando a porcentagem de células espermáticas móveis. Dentre as técnicas, o gradiente descontínuo de percoll é o mais difundido para a separação da porção viável e elegido para uso no laboratório Embrião (PARRISH, 1995; MACHADO, 2009). Invariavelmente, a taxa de produção de embriões sexados é menor em relação ao convencional perante peculiaridades como sua reduzida concentração e motilidade que limitam a seleção pelo gradiente de percoll

convencional, levando a elaboração de protocolos específicos para este tipo de sêmen, como o relatado a seguir (DELL'AQUA, 2006).

Em tubos de polietileno de 1,5 mL (Eppendorf) coloca-se meio Percoll 45% para sêmen convencional e meio Percoll 38% para o sexado e reserva-se em incubadora até o uso. Após selecionar o touro que se deseja, identifica-se a tampa de cada tubo com seu nome e finaliza o gradiente dos Eppendorfs, adicionando Percoll 90% ao fundo do tubo para sêmen convencional e Percoll 78 % para sêmen sexado. A palheta é então descongelada à 37°C por 30 seg e entregue ao técnico, o qual a deposita na superfície do gradiente do Eppendorfs e homogeneiza (Figura 5-A). Cada tubo de polietileno de 1,5 mL suporta até uma palheta de sêmen convencional e no sexado até duas palhetas. Em seguida, os tubos vão para duas rodadas na centrífuga.

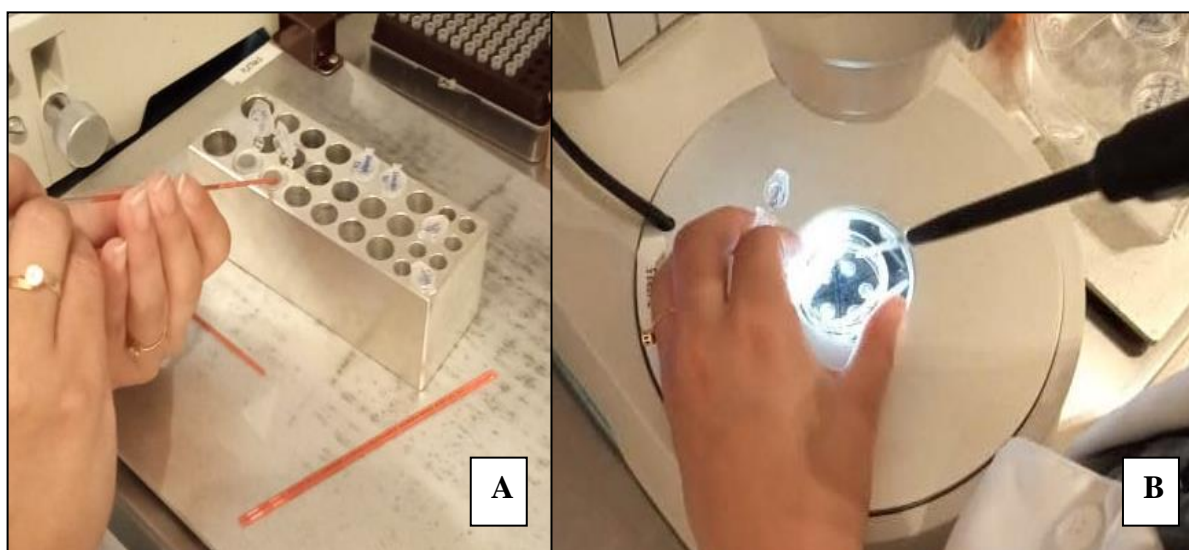
A centrifugação promove a seleção propriamente dita dos espermatozoides viáveis, distribuindo os componentes seminais em camadas de densidades variadas. Sujidades, debris celulares, espermatozoides com anormalidade de DNA permanecem na superfície, enquanto aqueles com morfologia alterada se concentram na porção medial e apenas as células móveis e viáveis conseguem penetrar na zona mais densa ao fundo do tubo (PERTOFT, 2000). Em centrífuga MiniSpin® Eppendorf, o sêmen convencional permanece 5 min a 9000 rpm e o sêmen sexado 5 min a 10000 rpm na primeira rodada, obtendo-se sobrenadante que é removido, permanecendo apenas um *pellet* de sêmen e Percoll ao fundo.

Para a segunda rodada de centrifugação, o *pellet* é ressuspenso pela adição de meio FIV Lavagem ABS, permanecendo na centrífuga por 3 min a 1000 rpm para o sêmen convencional e 3 min a 4000 rpm para sêmen sexado, a fim de remover o Percoll remanescente da amostra (PERTOFT, 2000). Finalizada a preparação do sêmen, a porção fecundante é retirada do fundo do tubo e alocada em outro Eppendorf menor (0,6 mL).

Com oócito e sêmen preparados procede-se a fertilização. Esse co-cultivo demanda um meio favorável tanto para a capacitação espermática como para a fecundação. O meio base comumente utilizado é o Fert-TALP, adicionado de PHE e HE, os quais estimulam o aumento da motilidade dos espermatozoides e incrementa a reação acrossômica, respectivamente, elevando a taxa de penetração nos oócitos bovinos (GONÇALVES, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2013). Ambos, PHE e HE, estão presentes no meio FIV Pronto ABS. A dose fecundante inicial para sêmen sexado é de 10 µl e no convencional 7 µl para cada gota, que são depositados juntamente com os oócitos nas placas de FIV (Figura 5-B). Caso o sêmen esteja pouco concentrado, ajusta-se a dose.

Por ser uma análise subjetiva, variável entre touros, não se sabe a concentração final empregada, mas segundo Gonçalves *et al* (2008), é em torno de 1 a 2×10^6 espermatozoides/mL a fração ideal. No momento da fertilização é avaliada a motilidade do sêmen e anotada a dose utilizada, assim como os responsáveis pelo preparo do oócito, rodagem do sêmen e fertilização. Em seguida, as placas vão para incubadoras de FIV à $38,5^\circ\text{C}$ e 5% CO_2 , permanecendo por 18-22 h, quando se encerra o processo da fertilização.

Figura 5 - A: Deposição do sêmen em eppendorf sob gradiente descontínuo de Percoll. **B:** Fertilização dos oócitos.



Fonte: Arquivo pessoal

3.1.3 Cultivo *in vitro* (CIV)

O cultivo é o período que compreende o desenvolvimento do zigoto até o estágio de blastocisto, abrangendo eventos de clivagem, ativação embrionária, diferenciação celular, formação de blastocele e rompimento da zona pelúcida, todos sensivelmente importantes na formação do embrião (SOUZA e ABADE, 2018). Com sete dias de desenvolvimento, as estruturas viáveis serão envasadas à fresco ou submetidas a uma técnica de criopreservação: vitrificação ou congelamento lento – embrião DT. Nessa etapa, o zigoto será transferido do meio FIV para o CIV, de modo que tenha suprimentos necessários. A composição do meio de CIV deve mimetizar os fluidos uterinos e de ovidutos, presentes no início da implantação embrionária, sendo capaz de nutrir durante os 7 dias de cultivo (LUSTOSA *et al.*, 2018). Logo, nas rotinas de PIVE, consolidou-se o emprego de Synthetic Oviductal Fluid (SOF)

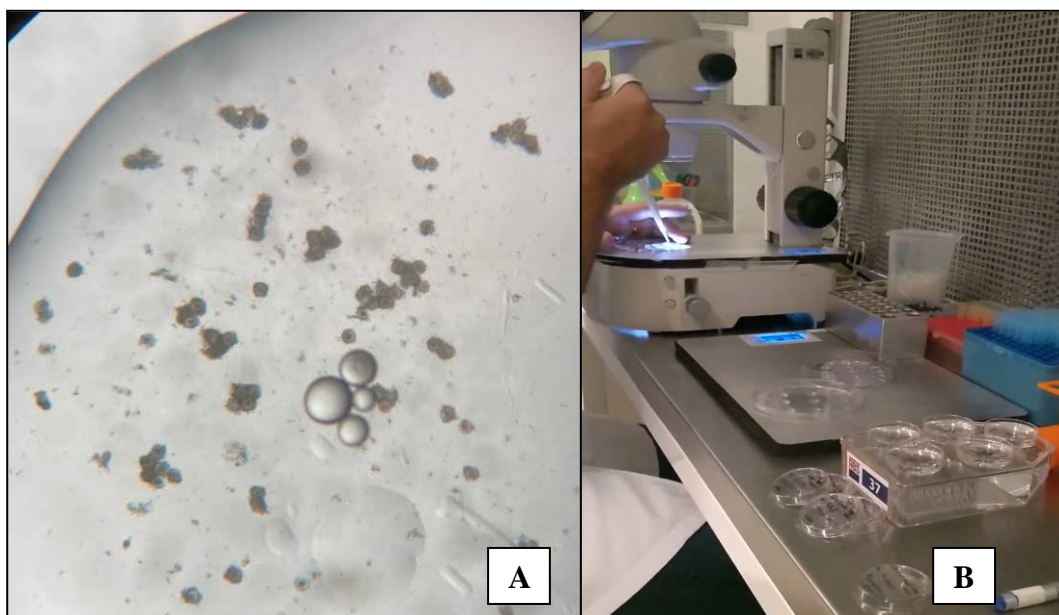
como meio de cultivo, um derivado de secreções de células epiteliais, adicionado de aminoácidos (GONÇALVES *et al.*, 2008).

O CIV é realizado no dia um (D1) e pode ser iniciado a partir de 13 horas do momento da FIV, apesar desta compreender entre 18-24 h. Em uma placa de petri (90 mm) são preparadas três gotas de meio. A primeira com meio TL lavagem ABS é onde os oócitos fecundados são depositados após retirados das placas de FIV (Figura 6-A). Nesta, serão lavados e desnudados mecanicamente através de múltiplas pipetagens no meio (Figura 6-B). Este processo promove a remoção das células do COC e espermatozoides remanescentes, potenciais competidores por nutrientes, deixando a zona pelúcida exposta.

Após o desnude, são colocados na segunda gota, composta de 50% de meio TL lavagem ABS e 50% meio CIV ABS, passando na sequência para a terceira gota, apenas com meio CIV ABS. Concluída a preparação do oócito fecundado, estes são contados e realocados em placas de CIV, onde permanecem até o dia 6 (D6), denominado previsão. Para controle, anota-se na ficha o responsável pelo cultivo, aquecimento do meio e o lote do mesmo. Assim como na FIV, as placas são previamente identificadas (nome do procedimento - CIV, nome do cliente, número das vacas, touro e data, quadrantes e gotas/vaca) e preparadas. As gotas contendo meio CIV ABS foram cobertas por óleo mineral e acrescidas de meio CIV ABS logo após. Cada gota recebe até 35 oócitos fecundados.

O diferencial nesta etapa é a baixa tensão de O₂ (5%), mantida alta nos processos anteriores (20%). Tensões oxigênio mais baixas nos cultivos *in vitro* são associadas a maiores taxas de produção de embriões como consequência de menor formação de espécies reativas de oxigênio. Apesar de ocorrer fisiologicamente, em excesso gera danos às células como retardo de desenvolvimento, disfunção metabólica e indução de apoptose (CORRÊA, 2006; BONFIM, 2017). As placas são então levadas à incubadora de CIV em atmosfera controlada (5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂) e umidade saturada a 38,5°C.

Figura 6 - A: Oócitos fecundados 24h após a FIV. **B:** Lavagem e desnude dos oócitos fecundados.

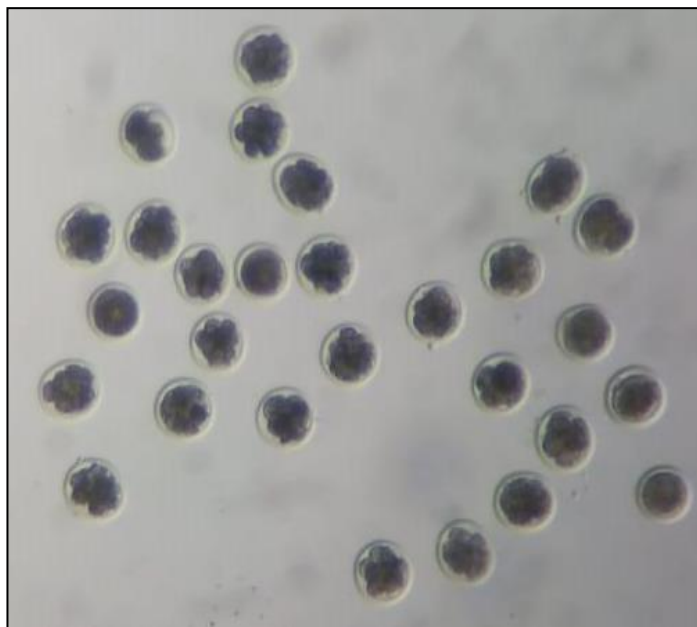


Fonte: Arquivo pessoal

3.1.4 Clivagem (CLIV)

Após quatro dias da FIV, no dia quatro (D4), procede-se a avaliação da taxa de clivagem do zigoto e renovação do meio de cultivo. Na própria placa de CIV são contabilizados os zigotos que clivaram (Figura 7). Em seguida, são retirados 50% de meio CIV ABS de cada gota, juntamente com as estruturas não clivadas e eram adicionados 50% de meio C5 *feeding* ABS, fornecendo mais substrato para o desenvolvimento embrionário. É anotado na ficha a quantidade de zigotos clivados referente a cada doadora, o nome do responsável, o lote do meio C5 e quem realizou o aquecimento. As placas retornam a incubadora de CIV até a previsão.

Figura 7 – Zigotos clivados e não clivados com 4 dias de desenvolvimento.



Fonte: Arquivo pessoal

3.1.5 Previsão

Nessa etapa será realizada a estimativa de embriões que se terá ao final do processo de produção. Ocorre no dia seis (D6) após a fertilização. Previamente são preparados tubos com meio H-SOF ABS, coberto por óleo mineral ABS, de modo a potencializar o desenvolvimento do embrião, sendo o mesmo meio que se utiliza no envase de embriões à fresco e vitrificado. Nas placas de CIV, os embriões são contados e em seguida destinados aos tubos de previsão, devidamente identificados com o número da doadora, nome do touro (em casos de acasalamento com dois ou mais) e nome do cliente.

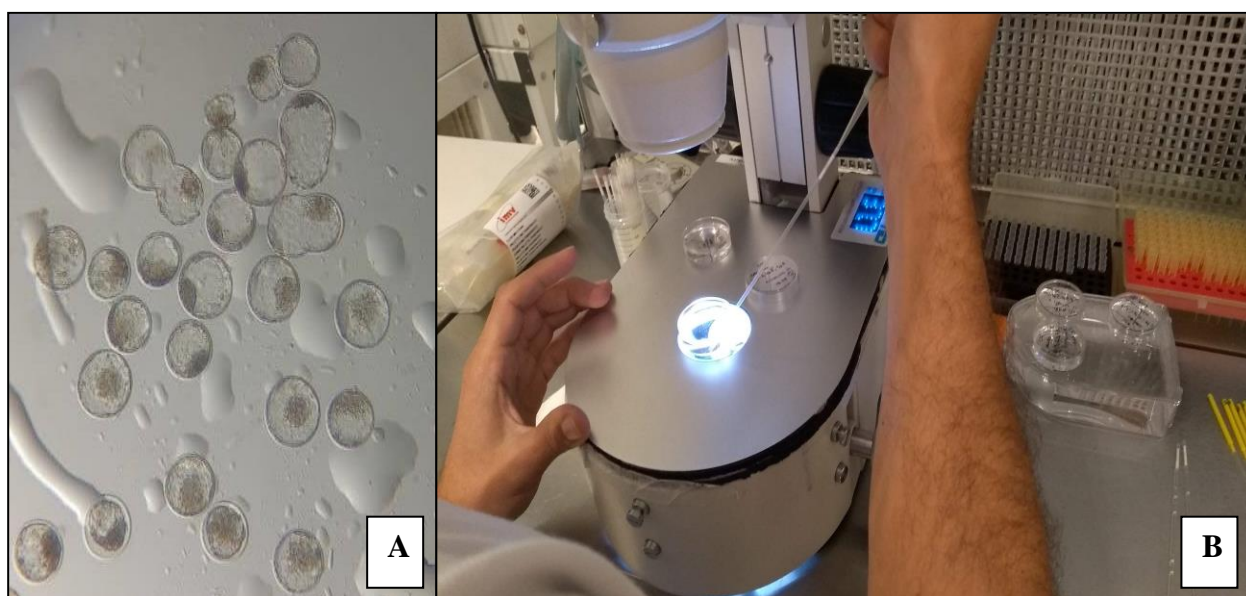
Nestes tubos, os embriões permanecem em incubadora até o dia seguinte, D7, quando serão envasados, vitrificados e/ou congelados DT. Em condições de longo percurso até a fazenda em que serão transferidos, os embriões podem sair com 5 dias após a FIV em tubos com meio MIX, composto por 50% de meio C5 ABS e 50% de meio H-SOF ABS, ou saem com 6 dias, em tubos com meio H-SOF ABS e ambos serem envasados na propriedade.

3.1.6 Embrião à fresco

Após sete dias de desenvolvimento *in vitro* (D7), os embriões estão aptos a serem transferidos para as vacas receptoras (Figura 8-A). Os embriões de cada doadora são retirados dos tubos de previsão, e em placa de petri com meio H-SOF ABS são depositados e classificados quanto ao estágio de desenvolvimento (MO – mórula, BI – blastocisto inicial, BL – blastocisto, BX – blastocisto expandido, BN – blastocisto em eclosão e BE – blastocisto eclodido). A ordem de envase prioriza os mais desenvolvidos (BE > MO). Para o envase se utiliza palhetas de 0,25 mL com uma seringa acoplada na extremidade que tem a buchinha, aspirando-se uma coluna de meio H-SOF ABS, uma bolha de ar, outra coluna de meio com o embrião, uma bolha de ar e por fim a última coluna de H-SOF ABS (Figura 8-B). Dessa forma, o embrião fica centralizado na palheta.

Depois de montada a palheta, esta é tampada com lacrador numerado e armazenada na transportadora de embriões em temperatura controlada $\pm 36,6^{\circ}\text{C}$. Cada palheta tem o número de seu lacrador anotado em ficha, mantendo correspondência com a vaca doadora, touro e classificação do embrião. Terminado o envase, os embriões seguem para a fazenda onde serão transferidos. Caso os embriões tenham que sair com cinco ou seis dias de desenvolvimento, esta etapa é realizada na propriedade.

Figura 8 – A: Blastocistos expandidos e em eclosão com sete dias de desenvolvimento. **B:** Envase à fresco de embriões.



3.1.7 Vitriificação

Em alternativa ao embrião à fresco, têm-se técnicas de criopreservação que mantêm essas estruturas viáveis por períodos indeterminados, dentre elas, a vitriificação. Popularizou-se pela praticidade comparada ao congelamento lento sendo atualmente a técnica de criopreservação mais utilizada, apresentando vantagens de rapidez, baixo custo e ser aplicável à campo (CARVALHO *et al.*, 2011). Esta consiste em um método de congelamento ultrarrápido, que faz uso de solução concentrada de crioprotetores (CPs) caracteristicamente viscosa, desidratando rapidamente o embrião e tornando-o permeável ao crioprotetor (SARAGUST e ARAV, 2011). Devido à natureza tóxica dos CPs, os embriões ficam expostos por curtos períodos e com volume mínimo de meio, submetidos a curvas acentuadas de resfriamento em nitrogênio líquido atingindo um estado vítreo sem a formação de cristais de gelo (DODE, 2013).

Para tal fim, dispositivos especiais de volume altamente reduzido que permitem a rápida troca de calor foram desenvolvidos, sendo o cryoloop, cryotop, microgotas, open pulled straw (OPS) (VAJTA, 1998) as técnicas mais difundidas (SARAGUST e ARAV, 2011). As OPSs são fabricadas artesanalmente a partir de palhetas convencionais estendidas sob calor, reduzindo até metade do seu diâmetro e extremidade em formato de bisel, assemelhando-se ao cryotop (Figura 9). Para identificação são numeradas com pincel de 1 a 4,4 (somatório dos pontinhos) em cores vermelho e preta. Trazem a vantagem do baixo custo, facilidade de armazenamento e mínimo uso de meio de criopreservação.

Figura 9: Dispositivo de vitriificação *open pulled straw* (OPS).



Fonte: Arquivo pessoal

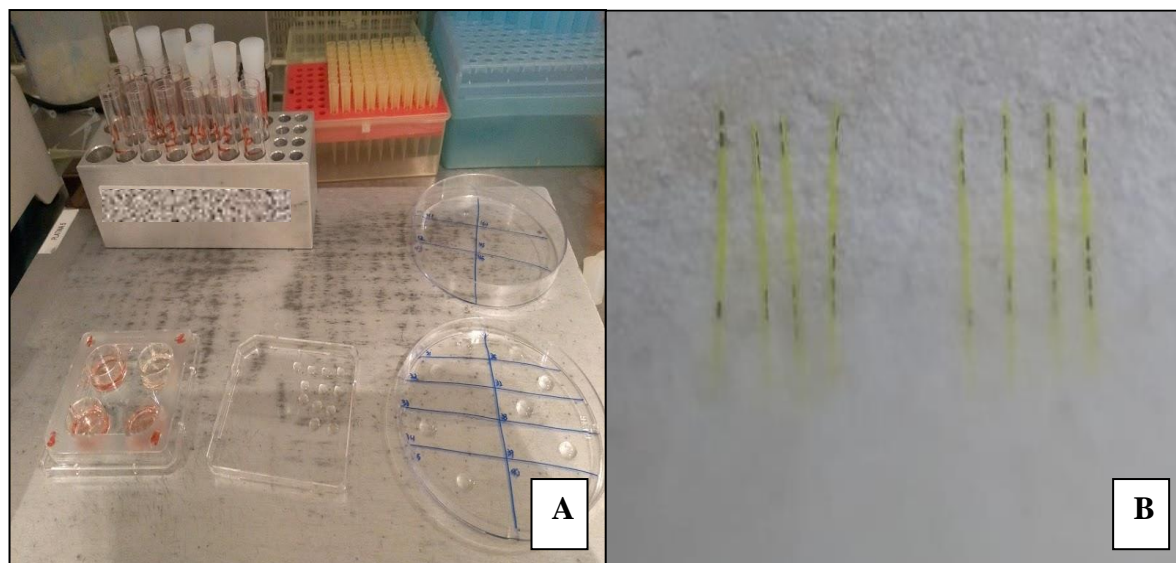
Em contrapartida, o contato direto da amostra com o nitrogênio favorece o risco de contaminações (CARVALHO *et al.*, 2011). No laboratório, o procedimento de vitrificação dispensa apenas 1 min e 20 segundos. É realizada com embriões de sete dias (D7), preferencialmente em estágio de blastocisto expandido (BX) por serem mais resistentes ao processo. Dos tubos de previsão, os embriões são colocados em gotas de meio H-SOF ABS em placas de petri, passando por quantificação e classificação (BI, BL, BX e BN).

De posse do total de embriões por doadora, na ficha, eles são listados em agrupamentos com no máximo 5 estruturas, que é o total máximo de cada OPS, ordenando a sequência de vitrificação, sempre priorizando estágios mais desenvolvidos. Em seguida, procede-se a vitrificação. Em uma placa de quatro poços, os embriões de uma doadora são colocados no poço 3 e de uma segunda doadora, no poço 4. Ambos os poços contêm solução de manutenção ABS e apenas o conteúdo de um poço é vitrificado por vez. Logo, os embriões do poço 3 são colocados no poço 1, composto por solução de manutenção ABS, Etilenoglicol (EG) ABS e Dimetilsulfóxido (DMSO) ABS e inicia a cronometragem do tempo.

Decorridos 30 segundos, uma gotinha de meio do poço 2 (solução mais concentrado de EG, DMSO e S1M) é colocado em uma placa de petri. Aos 50 segundos, os embriões são localizados, pipetados do poço 1 e aos 60 seg, depositados na gotinha do poço 2 (Figura 10-A). Nesta, permanecem por 15 seg e depois são posicionados na extremidade da OPS (sua cor e numeração são anotadas na ficha, mantendo correspondência com as informações dos embriões) com o mínimo de meio possível.

Com 1 min e 20 seg, a OPS é imersa em nitrogênio líquido, solidificando instantaneamente as células não permitindo a formação de cristais de gelo (VAJTA, 1998), e colocada na raque devidamente identificada. Após a vitrificação de todos os embriões, as OPSs são conferidas (Figura 10-B), assim como as demais informações. A raque é armazenada em botijão de nitrogênio por tempo indeterminado, até que se solicite sua desvitrificação.

Figura 10 - A: Materiais usados para vitrificação. **B:** Conferência de OPSs antes do armazenamento.



Fonte: Arquivo pessoal

3.1.7.1 Desvitrificação

Essa etapa é simples e pode ser realizada tanto no laboratório quanto a campo, desde que se tenha os meios de desvitrificação. Cada OPS é descongelada no período de 10 min. A OPS com os embriões desejados é retirada do nitrogênio e colocada no poço 1 da placa de quatro poços em solução de manutenção ABS e S1M ABS, iniciando o cronômetro. À medida que vão descongelando, de um por um, os embriões são colocados no poço 2, que apresenta a mesma concentração de meio que o poço 1. O somatório de tempo para poço 1 e 2 é 5 min. Em seguida, são passados para o poço 3 (solução de manutenção ABS e S1M menos concentrada que o poço 1 e 2), permanecendo mais 5 min e depois para o poço 4, apenas em solução de manutenção ABS. Esse processo promove a reidratação do embrião e remoção dos agentes CPs pelo uso de concentrações decrescentes do mesmo. A partir de agora já podem ser envasados, armazenados na transportadora e transferidos para as receptoras.

3.1.8 Congelamento lento – *Direct transfer*

Esse método de criopreservação permite que os embriões sejam transferidos diretamente para receptoras logo depois de descongelados, além de trazer a praticidade de descongelamento semelhante ao sêmen bovino, dispensando laboratorista e manuseio das

estruturas fora das palhetas como requer a técnica de vitrificação (DIESEL, 2018). Logo, diante de um grande número de embriões a serem transferidos num dia, há a otimização do tempo, eliminando problemas logísticos de deslocamento do laboratório à campo.

O congelamento de embriões, de forma geral, beneficia a comercialização de genética superior com distribuição mais eficiente de material genético em importações e exportações, como acontece com o sêmen atualmente (VOELKEL e HU 1992; FERRÉ *et al* 2020). Ainda que exija investimentos mais elevados em equipamentos, requer baixas concentrações de CPs minimizando os danos tóxicos sobre os embriões (DIESEL, 2018). O DT é realizado no D7 após a FIV, em meio com baixa quantidade de CPs permitindo a troca de água intracelular sem promover danos osmóticos e morfológicos acentuados. Os embriões são congelados por rodadas em agrupamentos de cinco vacas, até que se complete a quantidade requerida da máquina de congelamento.

Dos tubos de previsão, as estruturas são depositadas em uma gota na placa de petri e contabilizados os embriões viáveis e as perdas. Nessa técnica preconiza-se o estágio de BX, por serem mais resistentes. Ao passo que são contados, o auxiliar do laboratorista confere a quantidade de lacradores elaborados com os dados da previsão no D6, removendo o excedente ou solicitando mais. Repete-se o processo até finalizar as doadoras da rodada. Muito importante, a cada rodada, estimar os embriões da próxima sequência, pois a máquina de congelamento tem limite de palhetas (Cryogen HS Minilab®: 100 e 197 embriões, Crysalyz PTC-9500®: 60 e TK 3000®: 90 embriões) e tempo (40 min) para ser preenchida.

Depois de quantificados, os embriões vão ser preparados para o congelamento. Essa etapa tem duração máxima de 10 min. Após vários estudos sobre métodos de transferência direta, o ensaio de Voelkel e Hu (1992) com 1,5 M EG foi o mais efetivo, demonstrando sua alta permeabilidade, indicando este CP como uso potencial em procedimentos em que a reidratação ocorra no trato reprodutivo de receptoras, difundindo seu uso em todo o mundo. Na mesma placa de petri em que se encontram os embriões, é feita uma segunda gota com meio T2 ABS, e uma terceira gota com meio T1 ABS. Todas as estruturas da rodada são passadas para a segunda gota, em seguida, para a terceira gota. Individualmente, por doadora, os embriões são colocados na placa de quatro poços com meio T1 ABS, para iniciar o envase (Figura 11).

Com uma seringa acoplada na palheta 0,25 mL amarela, aspira-se duas colunas de meio GOTA ABS (H-SOF + T1), intercaladas por bolha de ar e uma terceira coluna de meio T1 ABS da placa de quatro poços contendo o embrião e finaliza com mais duas colunas de meio GOTAS ABS, intercaladas por ar. Ao mesmo tempo que são envasados, o auxiliar vai

fechando com os lacradores e marcando com pincel a primeira coluna de meio imediatamente anterior e posterior ao embrião, conforme mostra a Figura 12-A.

Finalizado o envase, aos 10 min, os embriões são colocados na máquina de congelamento estabilizada à -6°C . Após 2 min nesta, realiza-se o SEEDING, em que se “frita” por 1 seg a coluna de meio marcada anteriormente com pincel, utilizando dois cotonetes embebidos em NL2 (Figura 12-B). Essa marcação de pincel permite a fácil identificação do local correto do procedimento, evitando que se acerte o embrião e danifique-o.

Figura 11 – Envase de embriões para congelamento lento/DT.

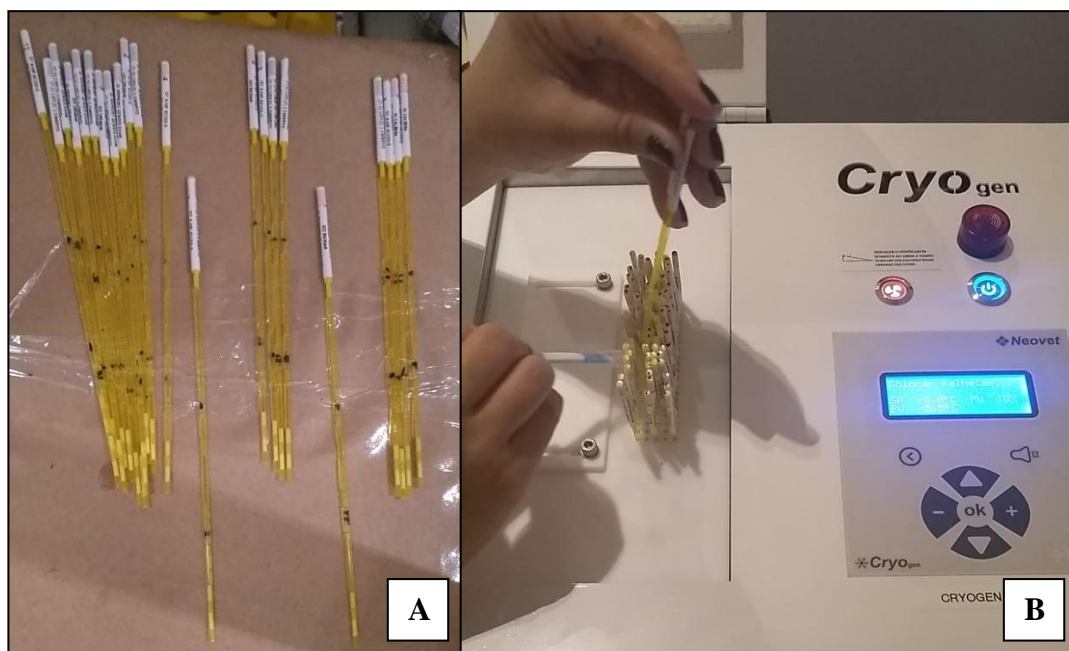


Fonte: Arquivo pessoal

O SEEDING é uma etapa muito importante de indução de cristalização, a qual inicia lentamente o congelamento do embrião (GONCALVES *et al.*, 2008). Ademais, outras rodadas podem ser adicionadas à máquina no prazo de 40 min de espera. Assim que preenchida, inicia-se a curva de congelamento, saindo de -6°C à -32°C em período de tempo variável com a marca do equipamento (Cryogen HS Minilab®: 1h 14 min, TK 3000®: 1h 08 min, Crysalyz PTC-9500®: 62 min).

À medida que vão sendo retirados da máquina, a cada doadora, conferem-se as informações do lacrador, das raques que vão ser armazenados e da ficha de controle, assim como a quantidade (raques G cabem 8 palhetas). As raques são levadas para o estoque de embriões e armazenadas em botijões de nitrogênio até que sejam solicitadas pelo cliente.

Figura 12 – A: Palhetas após envase com marcações da área do seeding prontas para congelamento. **B:** Seeding.



Fonte: Arquivo pessoal

Após o envase à fresco e armazenamento dos embriões criopreservados, chega-se ao fim o processo laboratorial para produção de embriões. O próximo passo é a campo, com transferência para as vacas receptoras, previamente sincronizadas. Infelizmente, não foi possível acompanhar esse procedimento durante o estágio.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de embriões produzidos *in vitro* é uma realidade em diversas propriedades, principalmente leiteiras, comprovando sua eficácia como biotecnologia melhoradora. É uma técnica acessível, contemplando desde o pequeno ao grande produtor, que busca um diferencial em seu rebanho.

Assim, o estágio curricular supervisionado foi de fundamental importância para o conhecimento dessa técnica. A afinidade com a área da reprodução animal, norteou a escolha do local de estágio e nele reafirmou o interesse em segui-la. Ademais, permitiu desenvolver novas habilidades e ter uma vivência profissional excepcional, fortalecendo os valores do trabalho em equipe, responsabilidade e compromisso.

A equipe técnica e demais colaboradores do laboratório possibilitaram participar de toda a rotina, tornando o estágio muito proveitoso. Logo, o convívio com diferentes profissionais, agregou muito ao desenvolvimento pessoal, técnico e social, complementando a formação iniciada na universidade.

REFERÊNCIAS

- ABS NEWS, Uberaba-MG, 5ª ed, p. 21-23, fev 2021. Disponível em: < [ABS News – Edição Fevereiro 2021 - ABS Global Brasil](#)>. Acesso em: 10 Abr. 2021.
- BOMFIM, M.M. **Efeitos do estresse oxidativo durante a produção in vitro de embriões bovinos sobre o miR-199a e genes alvo ERBB2 e ERBB3**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017. doi:10.11606/D.74.2017.tde-14062017-111158. Acesso em: 06 Abr. 2021.
- CARVALHO, A.A; FAUSTINO, Luciana Rocha; FIGUEIREDO, José Ricardo de; RODRIGUES, Ana Paula Ribeiro; COSTA, Amilton Paulo Raposo. Vitrificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró-RN, v.5, n.3, p.236-248, 2011.
- CHAVES, R.N; DUARTE, A.B.G; MATOS, M.H.T; FIGUEIREDO, J.R. Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte-MG, v.34, n.1, p.37-49, jan./mar. 2010.
- Malafaia, G.C.; Biscola, P.H.N.; Dias, F.R.T. A produtividade do rebanho bovino brasileiro em carcaças aumentou 80% em 20 anos. CiCarne, boletim informativo nº 8, 2020. Disponível em:< [Boletins – CiCarne](#)> . Acesso em: 10 Abr. 2021.
- CORRÊA, G.A. **Tensão de oxigênio durante o cultivo in vitro de embriões bovinos: efeito na produção e expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo**. 2006. 61 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.
- DA SILVA, J.S; BORGES, L.D.S; MARTINS, L.E.L.L; LIMA, L.A.D; BARBOSA, Y.G.S; SILVA, N.A.; BRITO, T.K.P. Aspectos comerciais da transferência de embriões e fertilização in vitro em bovinos - revisão Biotecnologias. **Nutritime Revista Eletrônica**. Viçosa-MG, v.12, n.5, p.4316-4319, set-out, 2015. ISSN: 1983-9006. Disponível em: <[Artigo-332.pdf \(nutritime.com.br\)](#)>. Acesso em: 05 Abr. 2021.
- DELL’AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O.; ARAÚJO JR., J.P.; FREITAS, C.P.; PONCHIROLI, C.B.; FIGUEIREDO, A.S.; MELO, C.M.; ALBERTI, K.; CRESPILO, A.M.; SIQUEIRA FILHO, E.R.; ORLANDI, C. 2006. Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre-RS, v. 34 (Supl 1): 205-212, 2006. Disponível em: <[anais sbte2006 final \(ufrgs.br\)](#)>. Acesso em: 06 Abr. 2021.
- DIESEL, T.O. **Delipidação química na produção in vitro e criopreservação de embriões bovinos**. 2018. 92 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Programa de pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Goiás (UFG), Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Goiânia, 2018.
- DODE, M.A.N.; LEME, L.O.; SPRICIGO, J.F.W. Criopreservação de embriões bovinos in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte-MG, v.37, n.2, p.145-150, 2013.

FERRÉ, L.B.; KJELLAND, M. E.; TAIYEB, A.M.; CAMPOS-CHILLON, L. F.; ROSS, P. J. Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, I. 6, p. 659-676, jun 2020. Disponível em: <[Recent progress in bovine in vitro-derived embryo cryotolerance: Impact of in vitro culture systems, advances in cryopreservation and future considerations - Ferré - 2020 - Reproduction in Domestic Animals - Wiley Online Library](#)>. Acesso em: 10 Abr. 2021.

GONÇALVES, F.S.; BARRETTO, L.S.S.; ARRUDA, R.P. et al. Heparin and penicillamine–hypotaurine–epinephrine (PHE) solution during bovine in vitro fertilization procedures impair the quality of spermatozoa but improve normal oocyte fecundation and early embryonic development. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 50 (1), p. 39–47, jan 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11626-013-9675-4>>. Acesso em: 06 Abr. 2021.

GONÇALVES, P.B.D.; BARRETA, M.H.; SANDRI, L.R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A.Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte - MG, v.31, n.2, p.212-217, abr./jun. 2007. Disponível em: <(Microsoft Word - RB073 Gon\347alves pag 212-217.doc) (cbra.org.br)> Acesso em: 07 Abr. 2021.

GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M.M.; VISINTIN, J.A.; COSTA, L. F. S. Produção in vitro de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. (eds.) **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª Edição. São Paulo: Roca, 2008.

GOTTARDI, F.P; MINGOTI, G.Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte-MG, v.33, n.2, p.82-94, abr./jun. 2009. Disponível em: <[Revisão Maturao in vitro \(cbra.org.br\)](#)>. Acesso em: 05 Abr. 2021.

LONERGAN, P. **Studies in the in vitromaturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes**. 1992. Thesis, National University of Ireland, Dublin, 1992.

LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of Oocytes in Vitro. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 255-268, 2016. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-animal-022114-110822>>. Acesso em 07 Abr. 2021.

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

LUSTOSA, A.A.; BARBOZA, N.A.; BARBOSA, Y.G.S.; RODRIGUES, P.K.O.; NETO, F.C.R.M. Aspectos relevantes na produção comercial de embriões bovinos por meio da técnica biotecnológica de fertilização in vitro: Revisão. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia (PUBVET)**. Maringa-PR, v.12, n.3, a51, p.1-6, Mar 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.22256/pubvet.v12n3a51.1-6>>. Acesso em: 09 Abr. 2021.

MACHADO, G.M.; CARVALHO, J.O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E.S.; FRANCO, M.M.; RUMPF, R.; DODE, M.A.N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, I. 8, p. 1289-1297, 2009. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.002>>. Acesso em: 07 Abr. 2021.

MARIANO, R.S.G.; USCATEGUI, R.A.R.; NOCITI, R.P.; BARROS, F.F.P.C.; RODRIGUEZ, M.G.K.; TAIRA, A.R. Aspiração folicular em ruminantes. **Revista Investigação**. Franca-SP, v. 14, n. 6, p. 46-53, 2015.

MELO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; SOUSA, S.L.G.; MELLO, M.R.B.; PALHANO, H.B. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte- MG, v.40, n.2, p.58-64, 2016. Disponível em: <[Microsoft Word - p58-64_RB602 \(cbra.org.br\)](#)>. Acesso em: 06 Abr. 2021.

PARRISH, J.J. Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparina. **Theriogenology**, v. 81, I. 1, p. 67-73, 2014. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.08.005>> Acesso em: 06 Abr. 2021.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, I. 6, p. 859-869, 1995. Disponível em:

<[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00271-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00271-9)> Acesso em: 07 Abr. 2021.

PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. **Journal of Biochemical Biophysical Methods**, v. 44, p. 1-30, 2000.

SARAGUSTY, J; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification, **Reproduction**, v. 141 (1), p. 1-19, 2011. Disponível em:

<<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/141/1/1.xml>> Acesso em: 08 Abr. 2021.

SIRARD, M.A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, I. 6, p. 1241-1254. 2001.

Disponível em: <[Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence - ScienceDirect](#)>. Acesso em: 07 Abr. 2021.

SOUZA, N.S; ABADE, C.C. Produção in vitro de embriões bovinos: etapas de produção e histórico no Brasil. **Ciência Veterinária UniFil**, Londrina-PA, v. 1, n. 3, p. 95-108, mar.

2019. ISSN 2595-7791. Disponível em: <<http://periodicos.unifil.br/index.php/revista-vet/article/view/988>>. Acesso em: 06 abr. 2021.

VAJTA G. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 53–58, 1998.

VOELKEL, S.A.; HU, Y.X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos.

Theriogenology, v. 37, I. 1, p. 23-37, Jan 1992. Disponível em: <[Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos - ScienceDirect](#)>. Acesso em: 05 Abr. 2021.

WARD, F.; ENRIGHT, B.; RIZOS D.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, v. 57, I. 8, p. 2105-2117, 2002. Disponível em: <[Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of](#)

[maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire - ScienceDirect](#)>.
Acesso em: 06 Abr. 2021.