



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

GISELE RAMOS DA SILVA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Araguaína, TO

2023

GISELE RAMOS DA SILVA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal do Norte do Tocantins, campus universitário de Araguaína como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador (a): Prof.^a. Dr.^a. Francisca Elda Ferreira Dias.

Araguaína, TO

2023

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

S586r Silva, Gisele Ramos da.
Relatório de estágio curricular supervisionado : Produção in vitro de embriões bovinos . / Gisele Ramos da Silva. – Araguaína, TO, 2023.
41 f.

Relatório de Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus
Universitário de Araguaína - Curso de Medicina Veterinária, 2023.

Orientador: Francisca Elda Ferreira Dias

1. PIVE. 2. Óocitos. 3. OPU. 4. Biotecnologia. 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).

GISELE RAMOS DA SILVA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal do Norte do Tocantins, campus universitário de Araguaína, Curso de Medicina Veterinária foi avaliado para a obtenção de título de bacharel em Medicina Veterinária e aprovada em sua forma final pelo orientar e pela banca examinadora.

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Francisca Elda Ferreira Dias.

Data de aprovação: 30 / 06 / 2023

Banca examinadora:

Prof. (a) Dr. (a) Francisca Elda Ferreira Dias, Orientadora - UFNT

Prof. (a) Dr. (a) Ana Kelen Felipe Lima, Examinadora - UFNT

M.V. Dr. Leandro Rodello, Examinador - InRepro.

Dedico

Ao meu pai Edilberto Mateus da Silva, que me preparou para o mundo, e me ensinou coisas que nenhuma universidade do mundo é capaz de ensinar...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora pelo dom da vida, pela providência divina, e por todas as pessoas que passaram pela minha vida até este feliz momento.

Ao meu pai Edilberto, e minha mãe Elisângelis, que proporcionaram até mesmo mais do que podiam, para dar a mim e minha irmã uma criação digna, com o suporte que necessitamos para estudar e crescer em um lar seguro.

A minha querida irmã Gislayne, com a qual cresci, e venho partilhando desde nossa infância mesmo que muitas vezes de longe as alegrias e angustias de viver, agradeço por seu amor incondicional.

A herança deixada por meu pai, meus tios, Luciano, Lucilane, José Domingos, e meu padrinho Nilberto, minhas Tias, Luzirene, Lusilene, Luzina e minha madrinha Raimunda. Meu coração é grato por todo apoio e amparo de sempre.

Ao Valdes que me presenteou com os frutos da amizade com meu pai, e a Santana Ribeiro sua esposa, que me acolheu em seu lar, e teve toda paciência e cuidado comigo, um verdadeiro anjo em minha vida. Eu não teria conseguido realizar este sonho sem vocês.

Ao João Lucas, que tem sido um excelente companheiro, eu me orgulho de trilhar a vida ao lado de um ser humano tão competente e comprometido, obrigada por me apoiar e incentivar meu crescimento sempre.

As amizades com os quais compartilhei a rotina universitária, e conseqüentemente tornaram mais leve está caminhada, Ana Carolina, Aurélio, Cíntia, Hayssa, Kariny, Mikaele, Sarah, Sandla, Sérgio, obrigada pelas risadas e choros coletivos.

Aos profissionais que me inspiraram a Professora Aline Morgado, uma profissional e ser humana incrível, ao Dr. Leandro Rodello, que me deu oportunidade de estagiar com grandes animais, me ensinou, me incentivou e fez com que eu me descobrisse no campo. A professora Priscilla Macedo que vem me proporcionando ser sua orientada e a professora Francisca Elda pela orientação nesta reta final.

A todos os profissionais que me receberam na UFPA campus de Medicina Veterinária em Castanhal-PA, residentes, estagiários, mestrados, em especial a Profa. Dra. Adriana Reis, que aceitou me supervisionar, tornando possível a realização deste trabalho.

RESUMO

O estágio supervisionado obrigatório, que como última disciplina do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT) tem como objetivo, a vivência da prática profissional. Foi realizado na Universidade Federal do Pará (UFPA) campus Castanhal, somando um total de 408 horas de estágio no período de 13 de março a 24 de maio de 2023. Tendo como orientadora a Profa. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias, e Supervisão da Profa. Dra. Adriana Novaes dos Reis. As atividades desenvolvidas foram realizadas em dois setores, a Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN), onde foram desenvolvidas atividades, de manejo reprodutivo e clínica de grandes animais e no Laboratório de Biotecnologia e Medicina de Animais da Amazônia (BIOMEDAM), no qual foram concentradas as práticas laboratoriais, com destaque para produção de embriões *in vitro* (PIVE) e a aspiração folicular por vídeo laparoscopia (LOPU). O presente relatório descreve a rotina de forma mais detalhada durante este período, com enfoque na PIVE.

Palavras-chaves: PIVE. Óocitos. OPU. Biotecnologia.

ABSTRACT

The mandatory supervised internship, which as the last discipline of the Veterinary Medicine Course at the Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT) aims to experience the professional practice. It was carried out at the Universidade Federal do Pará (UFPA) campus Castanhal, adding up to a total of 408 hours of internship in the period from March 13 to May 24, 2023. Supervised by Prof. Dr. Francisca Elda Ferreira Dias and supervised by Prof. Dr. Adriana Novaes dos Reis. The activities developed were performed in two sectors, the Central Animal Reproduction Biotechnology Center (CEBRAN), where activities of reproductive management and clinic of large animals were developed, and the Laboratory of Biotechnology and Medicine of Animals of the Amazon (BIOMEDAM), where laboratory practices were concentrated, with emphasis on the *in vitro* production of embryos (IVPE) and laparoscopic ovum pick up (LOPU). This report describes the routine in more detail during this period, focusing on IVPE.

Keywords: IVPE. Oocytes. OPU. Biotechnology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- A: Portão de entrada da CEBRAN. B: Sede da CEBRAN, onde está localizado laboratório e a administração da Central.	13
Figura 2- A: Búfalo macho da raça Murrah. B: Búfalo macho da raça Carabao. C: Búfala fêmea da raça Mediterrâneo.	14
Figura 3- Hospital veterinário de pequenos animais e animais silvestres, onde está localizado o BIOMEDAM.	15
Figura 4- A: Sala de cultivo celular, cabine de fluxo onde são manipulados os embriões. B: Sala de cultivo celular, geladeira e demais equipamentos usados durante a PIVE.	15
Figura 5- Vagina artificial, para coleta de sêmen de búfalo.	17
Figura 6- Coleta de sêmen de búfalo com vagina artificial.	18
Figura 7- A: Banho em touro para promover relaxamento. B: Palpação via retal das glândulas anexas do sistema reprodutor C: Exposição do pênis durante a palpação das glândulas anexas.	19
Figura 8- Curativo realizado em búfalo após descorna acidental, ocasionado por briga.	20
Figura 9- Curativo em casco de novilha com doença da linha branca.	21
Figura 10- Ultrassonografia abdominal em mini vaca, realizado durante curso de ultrassonografia abdominal e torácica em ruminantes.	22
Figura 11- A: Dispositivo intravaginal de P4 para ovinos e caprinos. B: Dispositivo intravaginal de P4 para ovinos e caprinos, sendo implantado em bezerra bubalina.	24
Figura 12- A: Laparoscopic ovum pick-up (LOPU), em bezerra bubalina. B: Laboratório montado a campo para rastreio e seleção de óocitos advindos da LOPU.	25
Figura 13- A: Seleção de embriões em estágio de desenvolvimento compatíveis. B: Câmera úmida, onde os embriões devem permanecer por 10 minutos após serem colocados na gota de Hoeschst C: Adição de parafina em lamina, para dispor embriões entre lamina e lamínula. D: Microscópio de epifluorescência. E: Embriões corados em estágio de blastocisto expandido.	26
Figura 14- Sala de cultivo celular passando por esterilização com luz UV por 10 minutos antes do início da produção de meio para MIV.	28
Figura 15 - Aspiração de folículos de ovário de vaca provenientes de abatedouro.	29
Figura 16- Líquido folicular sendo retirado de um tubo falcon onde está formado o “pellet” de óocitos, e passado para outro para ser levado para centrifugar e usado no rastreio.	30

Figura 17- Montagem da placa de MIV, para colocar óocitos rastreados e lavados em meio H199 e B199 na estufa para maturarem.	32
Figura 18- A: Placa de MIV identificada e colocada sobre a barca, para ser levada a estufa. B: Estufa onde acontece todo o processo de maturação de óocitos e desenvolvimento dos embriões.	33
Figura 19- A: Óocitos com células <i>cumulus oophorus compactadas</i> B: Óocitos com células do <i>cumulus oophorus</i> expandidas.	34
Figura 20- A: Coluna de Percoll, para seleção de espermatozóides viáveis. B: Câmara de Neubauer, usada para fazer a contagem dos espermatozóides.	35
Figura 21- A: Zigotos em fases iniciais de clivagem B: Seta verde: blastocisto inicial; Seta vermelha: blastocisto expandido; Seta amarela: blastocisto eclodido; Seta azul: zona pelúcida de um embrião que eclodiu.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades desenvolvidas na CEBRAN durante o estágio curricular supervisionado obrigatório, entre 14 de março a 24 de maio de 2023.....	16
Tabela 2 - Atividades desenvolvidas no BIOMEDAM durante o estágio curricular supervisionado obrigatório, entre 14 de março a 24 de maio de 2023.	23

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	LOCAL DE ESTÁGIO	13
2.1	Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN)	13
2.2	Laboratório de Biotecnologia e Medicina de Animais da Amazônia (BIOMEDAM)	14
3	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	16
3.1	Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN)	16
3.2	Biotecnologia e Medicina de animais da Amazônia (BIOMEDAM)	23
3.2.1	Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos (PIVE)	27
3.2.1.1	<i>Higienização do laboratório</i>	27
3.2.1.2	<i>Obtenção e rastreio dos óocitos</i>	28
3.2.1.3	<i>Maturação in vitro (MIV)</i>	31
3.2.1.4	<i>Fertilização in vitro (FIV)</i>	33
3.2.1.5	<i>Cultivo in vitro (CIV)</i>	35
3.2.1.6	<i>Clivagem</i>	36
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

O estágio Supervisionado obrigatório do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Norte do Tocantins, tem como finalidade proporcionar a vivência da prática, com enfoque na área de interesse, tendo como base os conhecimentos teóricos obtidos ao longo do curso, e assim, preparar os acadêmicos para inserção no mercado de trabalho.

Tendo isto em vista, o local de estágio escolhido foi a Universidade Federal do Pará, campus Castanhal-PA, com atividades concentradas na Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN), e o Laboratório de Biotecnologia e Medicina de animais da Amazônia (BIOMEDAM), entre os períodos de 13 de março de 2023 a 24 de maio de 2023, com carga horária total de 408 horas, sob a orientação da Profa. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias, e a supervisão da Profa. Dra. Adriana Novais dos Reis.

O enfoque principal do estágio é a reprodução de animais de produção, porém, também foi possível desenvolver atividades, voltadas para a clínica e cirurgia de grandes animais, o que agrega principalmente para o médico veterinário que pretende atuar no campo, dando a ele a capacidade de solucionar não apenas problemas produtivos e reprodutivos, mais também problemas de doenças do rebanho, curando e prevenindo o surgimento destas, assim atuando também no aspecto de saúde única.

Durante o estágio o estagiário teve oportunidade de desenvolver e/ou acompanhar várias atividades tais como: Coleta de sêmen de Búfalo c/ vagina artificial, condicionamento de bovino para a coleta de sêmen com eletroejaculador, atendimento clínico, diagnóstico de gestação por ultrassom e palpação em búfalas, produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE), aspiração de óocitos por laparoscopia (LOPU), acompanhamento de aulas práticas entre outras.

Neste relatório será descrito as atividades desenvolvidas durante o período de estágio, e será discutida mais detalhadamente a biotecnologia de produção de embriões bovinos *in vitro*, não comerciais. Isto devido à importância desta biotecnologia que acelera a evolução genética do rebanho, aumenta o número de descendentes de uma doadora entre outros. (NOGUEIRA; MINGOTI; NICACIO, 2013).

2 LOCAL DE ESTÁGIO

O estágio foi realizado no Instituto de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará (UFPA) campus Castanhal, com atividades na Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN), e o Laboratório de Biotecnologia e Medicina de animais da Amazônia (BIOMEDAM).

2.1 Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN)

A CEBRAN, está localizada na rua João Henrique de Carvalho, no Bairro da Saudade I, município de Castanhal-PA, que fica a aproximadamente Cerca de 70 km da capital do estado (Figura 1). Foi fundada em 1995, e hoje é uma unidade de pesquisa agropecuária vinculada a UFPA, Campus Castanhal, e tem como objetivo a criopreservação de sêmen de bovinos e bubalinos, produção de embriões, desenvolvimento de pesquisa, capacitação profissional através de cursos na área de reprodução, difusão de conhecimento técnico para pecuaristas do estado, adaptação de tecnologias na área da reprodução para atender a demanda regional e a distribuição de material genético superior.

Figura 1- A: Portão de entrada da CEBRAN. **B:** Sede da CEBRAN, onde está localizado laboratório e a administração da Central.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

A estrutura conta com laboratório para produção de embriões, análise envase e armazenamento de sêmen, currais, baias para abrigar reprodutores, estrutura própria para quarentena de animais que chegam de fora, bezerreiro, aprisco e área para produção de forragem, para atender a demanda alimentar dos animais da Central.

Atualmente, a CEBRAN abriga bubalinos das raças, Murrah, Carabao e Mediterrâneo (Figura 2), vacas mestiças, touros da raça Guzerá, equinos, ovinos e caprinos. A presença desses animais, faz com que a unidade também possua uma demanda clínica.

Figura 2- **A:** Búfalo macho da raça Murrah. **B:** Búfalo macho da raça Carabao. **C:** Búfala fêmea da raça Mediterrâneo.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

2.2 Laboratório de Biotecnologia e Medicina de Animais da Amazônia (BIOMEDAM)

O BIOMEDAM, está localizado dentro do Hospital veterinário de pequenos animais e animais silvestres da UFPA, Campus Castanhal-PA, na rodovia BR-316, na altura do km 61, Bairro Cristo Redentor com entrada através do Instituto Federal do Pará (IFPA) (Figura 3).

Este laboratório, tem como objetivo agregar na formação acadêmica, dos discentes da UFPA, por meio de aulas práticas, desenvolvimento de pesquisa e extensão, com enfoque na reprodução animal, abrangendo não só a reprodução dos animais domésticos, como bovinos e bubalinos, mas também, animais silvestres da Amazônia, contribuindo para a manutenção e preservação das espécies ameaçadas de extinção.

O laboratório, está dividido em cinco salas, cada qual com uma determinada finalidade, sendo elas: sala de análise hormonal, sala de Criobiologia, sala de análise Computadorizada espermática, sala de análise molecular e sala de cultivo celular (Figura 4), nesta por conta da rotina do laboratório, foi possível acompanhar a produção de embriões bovinos, já nas demais por não apresentarem tanta rotina, foi possível apenas acompanhar de forma esporádica o funcionamento de algumas.

Além disso o laboratório possui uma sala, onde é realizada a aspiração dos ovários advindos de abatedouro, e a esterilização de todo material utilizado no laboratório e no campo, está não possui comunicação direta com as demais salas.

Figura 3- Hospital veterinário de pequenos animais e animais silvestres, onde está localizado o BIOMEDAM.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

Figura 4- A: Sala de cultivo celular, cabine de fluxo onde são manipulados os embriões. **B:** Sala de cultivo celular, geladeira e demais equipamentos usados durante a PIVE.



A



B

Fonte: arquivo pessoal, 2023.

3 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o período de estágio, as atividades foram desenvolvidas conforme as demandas da CEBRAN e do BIOMEDAM. Quando os dois setores apresentavam demandas, o estagiário podia optar onde e qual atividade realizar, de acordo com seu interesse e vivência prática, baseando-se sempre no plano de atividades desenvolvido por sua supervisora.

3.1 Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN)

As atividades desenvolvidas na CEBRAN, concentravam-se em sua maioria em manejos reprodutivos, e clínica médica que estão destacados na tabela 1.

Tabela 1 - Atividades desenvolvidas na CEBRAN durante o estágio curricular supervisionado obrigatório, entre 14 de março a 24 de maio de 2023.

Atividades Desenvolvidas	Quantidade	
	N	%
Coleta de sêmen de Búfalo c/ vagina artificial	2	3,44
Condicionamento de Bovino p/ uso de eletroejaculador	1	1,72
DG por US em búfalas	16	27,58
IATF em búfalas	16	27,58
Atendimento clínico de ruminantes	7	12,06
Atendimento clínico de equinos	2	3,44
Auxílio e participação em aulas práticas	11	18,96
Preparo de ração	3	5,17
Total	58	100

DG: Diagnóstico gestacional. US: Ultrassonografia. IATF: Inseminação artificial em tempo fixo.

Fonte: elaborado pela autora (2023).

Dentre os manejos reprodutivos foi possível acompanhar e realizar a coleta de sêmen de búfalos com vagina artificial (Figura 5). Esta consistia em um tubo rígido com uma válvula, uma borracha flexível, denominada mucosa que reveste a parte interna do tubo, e um copo coletor em uma das extremidades onde é depositado o sêmen. Entre o tubo e a mucosa, formase um espaço, que por meio da válvula era adicionado água morna entre 42° a 45°C, e também controlada a pressão, ejetando ou retirando ar (CBRA, 2013). Na Central era utilizado uma espécie de camisinha que acabava aumentando a vida útil da mucosa.

Figura 5- Vagina artificial, para coleta de sêmen de búfalo.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

Para a coleta, utilizava-se uma fêmea bubalina como manequim, que era lavada com água, para retirar lama principalmente da região do períneo e evitar uma possível contaminação na hora da coleta. Em seguida a búfala era levada a um tronco de contenção, onde acontecia o salto. O macho também era banhado e contido em brete para a lavagem do prepúcio, realizada com uma solução higienizante Kilo1-L[®] (FERNANDES *et al.*, 2013) dissolvido em água destilada na proporção de 4%. Em seguida, o macho era guiado até a fêmea por um assistente, e quando o salto era realizado pelo reprodutor fazia-se o desvio do pênis, segurando-se no prepúcio do animal, a vagina artificial deveria estar em sincronia com o movimento do reprodutor afim de evitar que o pênis atingisse o copo coletor, e acabasse lesionando o órgão (Figura 6).

Figura 6- Coleta de sêmen de búfalo com vagina artificial.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

O manejo para condicionamento de Touro, para a coleta de sêmen por eletroejaculador, era realizado semanalmente, com objetivo de promover uma adaptação a interação humana, já que no início do processo o animal demonstrava-se temperamental, o que dificultava a interação com residentes e tratadores, tornando-a até mesmo perigosa. O Touro tratava-se de um adulto da raça Guzerá, pesava cerca de 890 kg, sendo este um fator limitante para a coleta de sêmen com vagina artificial já que na Central não havia manequim que suportasse o seu peso.

O condicionamento consistia em conduzir o touro da baia para um brete onde este era banhado e escovado, para relaxá-lo, e promover uma dessensibilização, quanto ao toque, e estabelecer uma memória positiva para posteriores manejos, em seguida era realizado a massagem das glândulas anexas reprodutivas via palpação retal, sendo possível massagear as ampolas, glândulas vesiculares e palpar a próstata, o que pode gerar exposição do pênis e adaptar o animal a presença de um objeto na ampola retal (Figura 7).

Figura 7- A: Banho em touro para promover relaxamento. **B:** Palpação via retal das glândulas anexas do sistema reprodutor **C:** Exposição do pênis durante a palpação das glândulas anexas.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

O proprietário do animal desejava obter entre 400 a 500 doses de sêmen, no entanto, não foi possível acompanhar até o término do estágio a coleta e o envase do sêmen deste touro, mas é notável o progresso obtido através das medidas adotadas, que tornou o animal menos resistente ao manejo.

O início do protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), aconteceu após a ultrassonografia retal ter demonstrado a ausência de prenhes nas bubalinas da central. O protocolo realizado foi de 4 manejos, em um total de 16 búfalas. No D0 foi realizado implante intravaginal de progesterona (P4) (Primer[®]) reutilizável e 2 ml de benzoato de estradiol (Ricbe[®]) por via intramuscular (IM), no D8, 2 ml de prostaglandina F2 α (Lutalyse[®]) IM. Já no D9, aconteceu a retirada do implante de P4 e a administração IM de 0,5 ml de Cipionato de estradiol (ECP[®]) e 1,5 ml de gonadotrofina coriônica equina (ECG) (Norvormon[®]) e no D11 as búfalas foram inseminadas no período vespertino.

Os atendimentos clínicos em ruminantes e equinos baseava-se em sua grande maioria em curativos de feridas ocasionado por miíases, ou acidentes na central (Figura 8), e também casqueamento preventivo e curativo de casco. Os problemas de casco eram mais frequentes em bovinos devido à umidade da região, o que gerava um amolecimento destes, e predisponha a lesões ocasionadas por piso rígido ou até mesmo pedras, o que acabavam se tornando uma porta de entrada para microrganismos oportunistas.

Figura 8- Curativo realizado em búfalo após descorna acidental, ocasionado por briga.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

O curativo no casco (Figura 9), era realizado depois de uma rigorosa inspeção, o que exigia uma limpeza com água e sabão a fim de retirar a sujidades para facilitar a visualização de possíveis lesões. Após notar-se a presença de alguma lesão, realizava-se a retirada com um rinete e com uma pinça verificava-se a sua extensão, sendo esta extensa era realizado o bloqueio de Bier. Após a retirada da área comprometida, era realizado o curativo para proteger e impermeabilizar o casco. Em seguida o animal era colocado em uma baia limpa e com cama de maravalha. O curativo era realizado uma vez por semana.

Figura 9- Curativo em casco de novilha com doença da linha branca.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

Foi possível também participar e auxiliar em aulas práticas de análise, envase e criopreservação de sêmen, avaliação ginecológica e ultrassonografia retal, transferência de embrião, contenção de grandes animais, curso de ultrassonografia abdominal e torácica de ruminantes (Figura 10), além de participação em discussões de caso com os residentes e auxiliar na produção de ração para os animais da CEBRAN.

Figura 10-Ultrassonografia abdominal em mini vaca, realizado durante curso de ultrassonografia abdominal e torácica em ruminantes.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

3.2 Biotecnologia e Medicina de animais da Amazônia (BIOMEDAM)

Neste setor, foi possível acompanhar a rotina do laboratório, como a produção de embriões *in vitro* (Tabela 2) que será discutida mais detalhadamente a seguir.

Tabela 2-Atividades desenvolvidas no BIOMEDAM durante o estágio curricular supervisionado obrigatório, entre 14 de março a 24 de maio de 2023.

Atividades Desenvolvidas	Quantidade	
	N	%
PIVE	11	26,83
LOPU	9	21,95
Coloração de embriões c/ Hoechst	3	7,31
Esterilização de material utilizado no laboratório	5	12,20
Limpeza do laboratório	3	7,31
Auxílio e participação em aulas	2	4,88
DG por palpação em Búfalas	8	19,51
Total	41	100

PIVE: Produção de embriões *in vitro*. LOPU: Aspiração de óocitos por vídeo laparoscopia. DG: diagnóstico gestacional.

Fonte: elaborado pela autora (2023).

A LOPU foi realizada em bezerras bubalinas de 4 meses de idade, pertencentes a uma fazenda leiteira, localizada aproximadamente 30 km da área urbana de castanhal. As cirurgias aconteceram na própria fazenda, em área coberta, assim como o rastreo e seleção dos óocitos em um laboratório improvisado na propriedade.

O protocolo hormonal a qual as bezerras eram submetidas, consistia em implantação de dispositivo intravaginal de P4 0,36g (Primer PR[®]) (Figura 11), por 5 dias, e 1000 UI/animal de ECG (Norvormon[®]), 48 horas antes da LOPU. Os animais selecionados para o procedimento passavam por um jejum de 36 horas para sólidos e 24 horas para líquido. A anestesia realizada era a dissociativa: Xilazina 0,1mg/kg/IM, lidocaína 5 ml epidural e 10 ml local.

Figura 11- A: Dispositivo intravaginal de P4 para ovinos e caprinos. **B:** Dispositivo intravaginal de P4 para ovinos e caprinos, sendo implantado em bezerra bubalina.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

O procedimento se dava início após o animal ser colocado sobre uma mesa cirúrgica adaptada com um declínio de 45° graus em posição de cefalodeclive, onde era realizada a antissepsia e a anestesia local nos pontos de incisão. Inicialmente era realizado 2 incisões com tamanho aproximado de 1,5 cm, uma do lado direito e outra do lado esquerdo abaixo da cicatriz umbilical, sendo a do lado esquerdo para a inserção do laparoscópio e o insuflador, e do lado direito para inserção da pinça de babcock (Figura 12 A). Após localizado e pinçado o ovário, uma agulha era inserida aproximadamente entre os úberes do animal, e assim realizado a aspiração folicular (Figura 12 A), para evitar aderências, após a aspiração o ovário era lavado com uma solução composta de solução fisiológica e lidocaína. Por fim, o líquido folicular era encaminhado para o laboratório de campo (Figura 12 B), onde eram realizados o rastreio e a seleção dos óocitos puncionados, levados a uma incubadora a 38°C em meio de lavagem (H199) e levado para o laboratório do BIOMEDAM, para a realização da PIVE. No pós-operatório era administrado oxitetraciclina 10 mg/ kg/ IM (Terramicina[®]) e flunixin meglumine 1,5 mg/ kg/IM (Banamine[®]) no animal.

Figura 12- A: Laparoscopic *ovum pick-up* (LOPU), em bezerra bubalina. **B:** Laboratório montado a campo para rastreamento e seleção de óocitos advindos da LOPU.



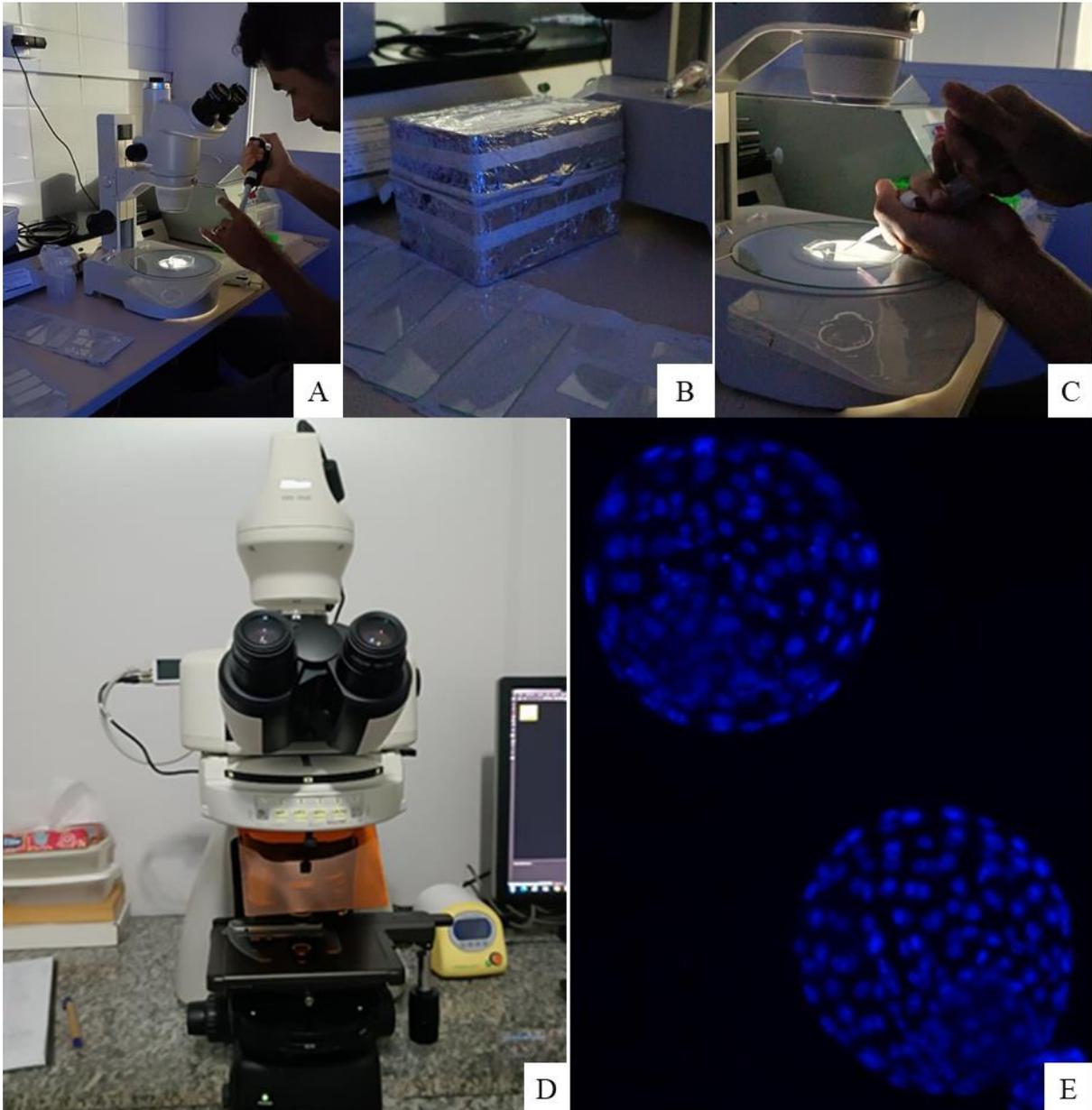
Fonte: arquivo pessoal, 2023.

Em laboratório foi realizado a coloração de embriões com corante de Hoeschst, que tem como finalidade, a contagem de células do embrião, isso porque na PIVE para fins de pesquisa, os embriões não são implantados em uma receptora, sendo assim a quantidade de células presente no embrião é um indicador de qualidade, e é exigido para publicação de trabalhos em algumas revistas.

Para corar era necessário, primeiramente separar os embriões de acordo com seu estágio de desenvolvimento (Figura 13 A), pois ao colocar embriões de diferentes estágios em uma só lâmina, pode ser afetado a contagem do embrião que não sofreu uma leve compactação, o que é importante pois facilita a contagem das células. Em seguida os embriões eram lavados em 2 gotas de 30 μ l de solução salina tamponada fosfatada (PBS) e polivinilpirrolidona (PVP), colocado em uma gota com o corante de Hoeschst, que era previamente diluído (1 μ l de Hoeschst para 99 μ l de solução de PBS e PVP) e levado a câmara úmida por 10 minutos (Figura 13 B), a sala onde acontece o procedimento deve estar com a menor quantidade de luz possível, pois a luz inibe o corante de Hoeschst. Após os 10 minutos deve-se dispor esses embriões entre uma lâmina e uma lamínula. Na lâmina é necessário que se coloque em suas laterais parafina, para evitar colapamento com a lamínula (Figura 13 C), o que provocaria o rompimento do embrião. Em seguida a lâmina era levada a um microscópio de epifluorescência sobre o shutter

de 8 em um tempo de exposição de 100 milésimos de segundos (Figura 13 D) e fotografado de diferentes ângulos para a contagem dessas células (Figura 13 E).

Figura 13- **A:** Seleção de embriões em estágio de desenvolvimento compatíveis. **B:** Câmera úmida, onde os embriões devem permanecer por 10 minutos após serem colocados na gota de Hoeschst **C:** Adição de parafina em lamina, para dispor embriões entre lamina e lamínula. **D:** Microscópio de epifluorescência. **E:** Embriões corados em estágio de blastocisto expandido.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

3.2.1 Produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE)

A PIVE é uma das ferramentas capazes de proporcionar o melhoramento genético, de um rebanho, de forma célere, pois possibilita o aumento do número de descendentes de uma fêmea geneticamente superior, que pode ser submetida aos mais diversos acasalamentos, diminuindo riscos de transmissão de doenças e custos com transportes de animais vivos (SARTORI; DODE; RUMPF, 2010). Permite a obtenção de produtos de fêmeas, acometidas por alguma enfermidade que comprometa sua vida reprodutiva, seja na monta natural ou na inseminação artificial, (NOGUEIRA; MINGOTI; NICACIO, 2013) e viabiliza pesquisas, sem a necessidade de realizá-las em animais de laboratório (GONÇALVES *et al.*, 2008).

Esta biotécnica consiste em obtenção de óocitos, maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo ou co-cultivo *in vitro* (CIV) (GONÇALVES *et al.*, 2008), que leva um período de 7 dias a até que o embrião possa ser transferido para uma receptora ou envasado para posterior uso (SARTORI; DODE; RUMPF, 2010). A obtenção de óocitos pode ser guiada por ultrassonografia (*Ovum pick-up* - OPU), por laparotomia, por vídeo laparoscopia (LOPU), dissecação folicular de ovários (*Chopper*) ou a partir da aspiração de ovários coletados em abatedouros (ADONA *et al.*, 2017), sendo este método o mais acompanhado durante o período de estágio.

3.2.1.1 Higienização do laboratório

Um ponto de suma importância para o sucesso da PIVE era a higienização do laboratório, esta era realizada uma vez por semana, pelos estagiários e mestrandos do BIOMEDAM, apenas com água sanitária e álcool 70%. Além disso, sempre antes do início de produção de meios ou manipulação de óocitos e embriões a sala de cultivo celular passava por uma esterilização com raio UV por 10 minutos (Figura 14), com objetivo de diminuir as chances de contaminação de meios o que ocasionaria a perda dos embriões. Outra forma de diminuir o índice de contaminação advindas do meio externo era a utilização de calçados próprios para o uso dentro do laboratório. Também se utilizava máscara, touca, jaleco e fazia-se a higienização das mãos frequentemente.

Figura 14- Sala de cultivo celular passando por esterilização com luz UV por 10 minutos antes do início da produção de meio para MIV.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

3.2.1.2 Obtenção e rastreamento dos óocitos

Os ovários coletados durante o abate em frigorífico, eram armazenados e transportados em solução salina a 0,9% em uma temperatura de 30°C, e não se levava mais que 3 horas após a coleta para que os ovários fossem puncionados, atendendo assim a recomendação de tempo ideal entre a saída dos ovários do abatedouro até a adição dos óocitos no meio de MIV que é de 4-6 horas. (ADONA *et al.*, 2017).

Os folículos puncionados obedeciam ao padrão de tamanho de 2 a 8 mm (GONÇALVES *et al.*, 2008). Isso por que os folículos dentro deste intervalo, estão em um estágio de competência para ovulação (ADONA *et al.*, 2013). A punção era realizada com uma agulha 40 por 0,8 mm 21 G ½, acoplada a uma seringa de 20 ml (Figura 15) na sala suja. Todo o conteúdo da seringa era colocado em um tubo falcon de 15 ml, que quando repleto era levado para a sala de cultivo celular, aguardava-se 15 minutos para que os óocitos se precipitassem no fundo do tubo, e em seguida retirava-se com uma pipeta de 1000 µL (Figura 16), e adicionados a uma placa de Petri, para dar início ao rastreamento dos óocitos viáveis.

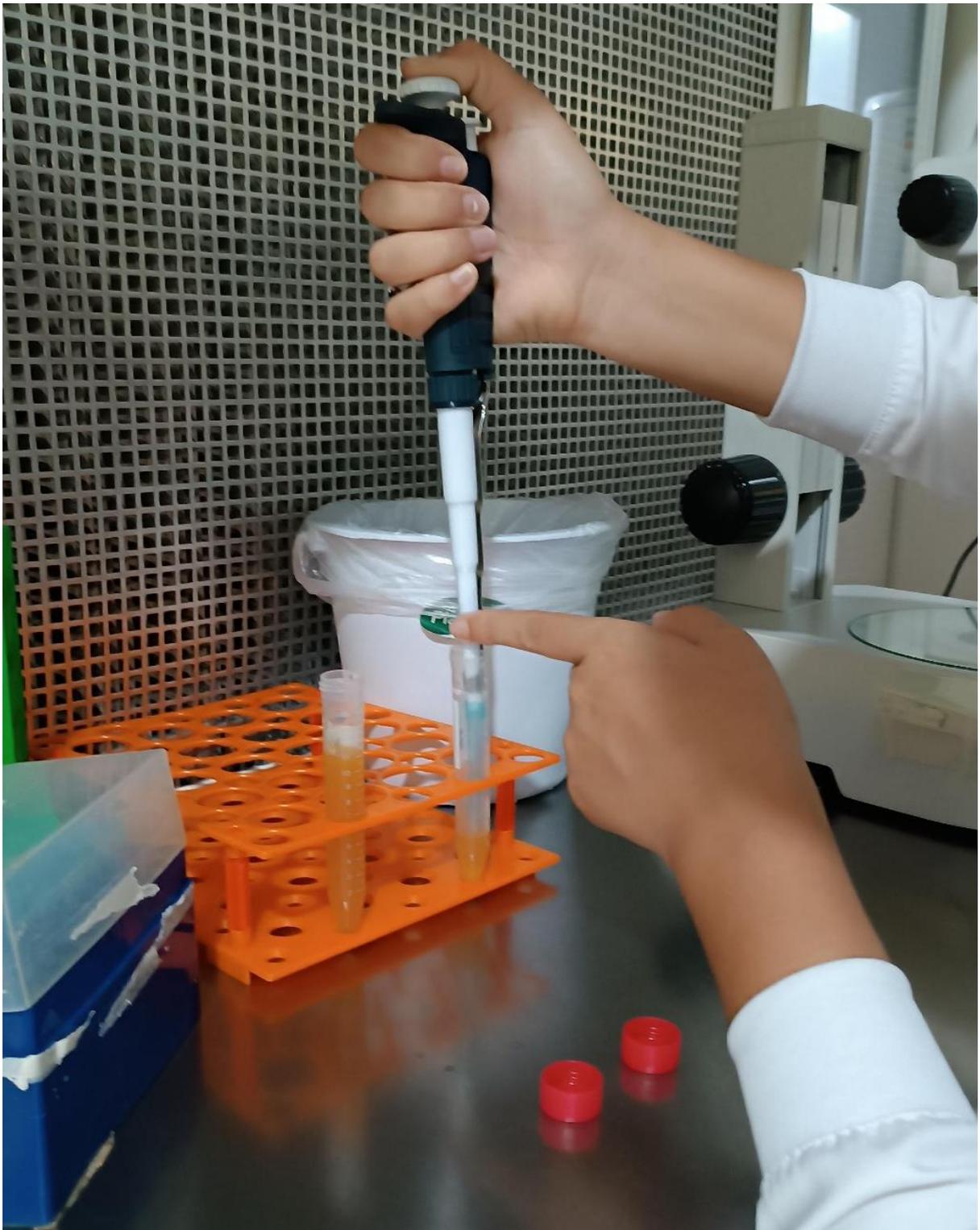
Figura 15 - Aspiração de folículos de ovário de vaca provenientes de abatedouro.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

Para facilitar o rastreio o líquido folicular sobrenadante era levado para a centrífuga por 5 minutos, para que precipitasse os restos celulares e sujidades no fundo do tubo falcon. O líquido folicular, agora limpo, era utilizado como um meio para facilitar o rastreio dos óocitos presentes no “pellet”.

Figura 16- Líquido folicular sendo retirado de um tubo falcon onde está formado o “*pellet*” de ócitos, e passado para outro para ser levado para centrifugar e usado no rastreio.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

Durante o rastreio, os ócitos selecionados eram os que obtinham as seguintes características: presença de complexo *cumulus oophorus* (COC), citoplasma uniforme e sem granulações e coloração marrom claro (GONÇALVES *et al.*, 2008). Desse modo, os ócitos

foram classificados em grau I e II, onde grau I são os óocitos com COC compacto com mais de três camadas do *cumulus* e citoplasma homogêneo, e o de grau II os que apresentam COC compacto, porém com menos de três camadas de células do *cumulus*, com citoplasma também homogêneo ou levemente heterogêneo (DE LOOS *et al.*, 1989), respectivamente.

3.2.1.3 Maturação *in vitro* (MIV)

O propósito da MIV é possibilitar condições capazes de promover mudanças nucleares e citoplasmáticas, do óocito o tornando apto para ser fecundado (SARTORI; DODE; RUMPF, 2010).

A coleta dos ovários acontecia sempre no período vespertino, sendo assim pela manhã eram preparados os meios usados para a maturação e para a lavagem dos óocitos. Os meios usados nesta etapa eram: meio H199 para lavagem dos óocitos após rastreio, e meio B199 que era usado na placa de maturação.

Após o rastreio, os óocitos eram lavados em no mínimo três gotas de meio H199, de modo que todos os óocitos eram transferidos para uma gota, e em seguida transferidos para outra gota, e assim respectivamente, até verificar-se que não havia mais sujidades apenas os óocitos na gota limpa. Este meio é composto de uma solução tampão própria para uso fora da estufa, denominado HEPES. Era preparado com Medium 199 (Sigma[®]), soro fetal bovino (SFB), piruvato e um antibiótico, sendo este a gentamicina.

Em seguida os óocitos eram lavados em meio B199, que também é composto por uma solução tampão, o bicarbonato, necessária para manutenção do meio de MIV dentro da estufa. A lavagem com meio B199, era necessária para limpar os óocitos do meio H199, e enfim, poder-lhes agrega-los a gota de maturação composta apenas por B199. O preparo do meio B199 era realizado com Medium 199 (Gibco[®]), piruvato, SFB, gentamicina, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) (ADONA *et al.*, 2008). As substâncias que compõem o meio de maturação são responsáveis por suprir as demandas energéticas e nutricionais do óocito durante este processo.

Cada gota de maturação que formava a placa de cultivo celular possuía 100 µL de meio B199. A montagem da placa se dava da seguinte forma: primeiramente adicionava-se na placa de cultivo celular, gotas de 25 µL (Figura 17) com auxílio de uma pipeta. Estas gotas iniciais eram usadas como marcação, isto porque ao se colocar uma gota de 100 µL de uma vez na placa de cultivo, as gotas, acabavam se fundindo as outras. Após a marcação, adicionava-se óleo mineral na placa de cultivo, para evitar a evaporação, e a fusão de uma gota com a outra, a

quantidade necessária era suficiente para cobrir todas as gotas presentes na placa. Em seguida era regulada a pipeta para 75 μL , adicionava-se essa quantidade em cada gota de 25 μL da placa, formando assim as gotas de 100 μL . Em cada gota de 100 μL poderia ser colocado até 20 óocitos (ADONA *et al.*, 2008).

Figura 17- Montagem da placa de MIV, para colocar óocitos rastreados e lavados em meio H199 e B199 na estufa para maturarem.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

A placa de MIV era colocada sobre uma pequena garrafa, chamada de “barca”, que continha água, com o objetivo de auxiliar na manutenção de temperatura do meio, quando fosse necessário realizar a manipulação da placa fora da estufa, evitando o contato da placa de cultivo diretamente com a bancada, e ainda auxiliando em seu transporte, devido a placa de cultivo ser bem pequena. A barca era identificada com nome e data e levada a estufa (Figura 18 A). A estufa deveria estar regulada a uma temperatura de 38,5 °C, CO₂ a 5% e umidade de 90% (ADONA *et al.*, 2008) (Figura 18 B), pois a mesma deve simular o máximo possível o ambiente *in vivo*. Os óocitos permaneciam na placa de maturação na estufa por 22 horas (GONÇALVES *et al.*, 2008).

Figura 18- **A:** Placa de MIV identificada e colocada sobre a barca, para ser levada a estufa. **B:** Estufa onde acontece todo o processo de maturação de óocitos e desenvolvimento dos embriões.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

3.2.1.4 Fertilização *in vitro* (FIV)

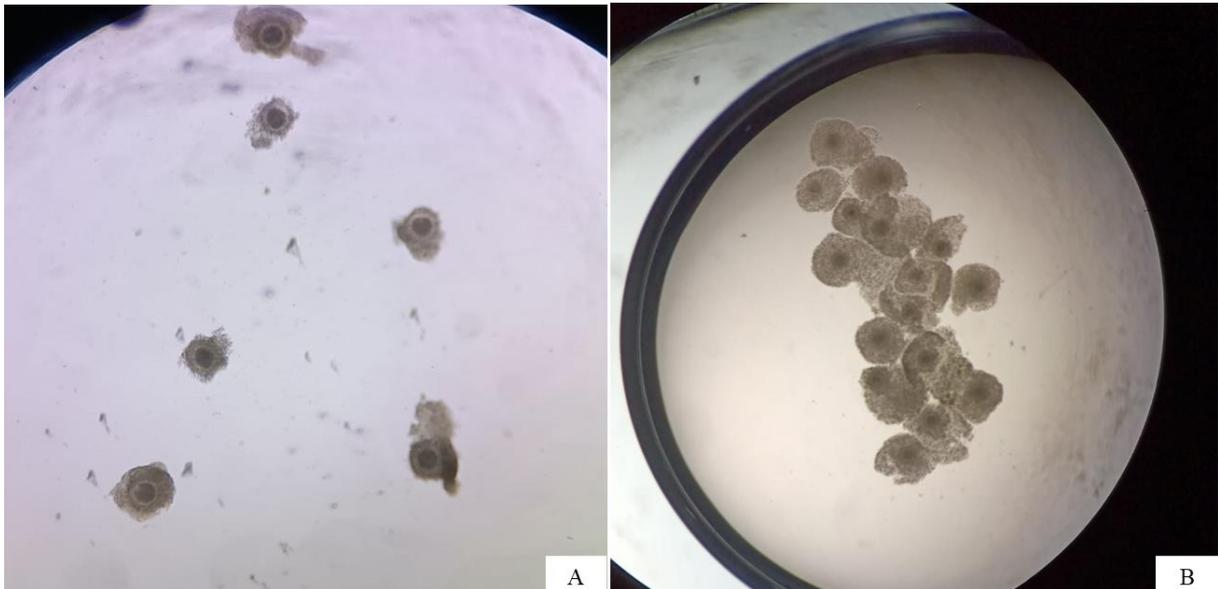
No dia seguinte, era realizada a verificação morfológica dos óocitos que foram colocados para maturarem, visualmente os óocitos que estavam em processo de maturação, e teriam mais chances de tonarem-se futuros embriões, apresentavam as células do *cumulus* expandidas (Figura 19 B), diferentemente dos óocitos do dia anterior, que apresentavam as células do *cumulus* compactadas (Figura 19 A) (GILCHRIST; THOMPSON, 2007).

Nesta fase, previamente era preparado o meio de FIV, que além de ser usado como meio da placa de FIV, também era usado para montar a coluna de Percoll que separa os espermatozoides viáveis dos não viáveis, para lavagem dos espermatozoides, e ainda lavagem dos óocitos para limpá-los do meio de maturação. Este meio é composto de albumina lactato piruvato (TALP –FIV), heparina, Albumina Sérica Bovina (BSA), Penicilina, Hipotaurina e Epinefrina (PHE) e piruvato (ADONA *et al.*, 2008).

A heparina é responsável por capacitar os espermatozoides *in vitro*. *In vivo* a capacitação espermática ocorre na região do istmo, e promove a ativação do acrossoma, necessária para a penetração no óvulo. Após a passagem do espermatozoide pela zona pelúcida, acontece o bloqueio a polispermia, que impede que outros espermatozoides adentrem o óvulo e acabe gerando embriões poliplóides, ou seja, que apresentam um número maior de cromossomos, o

que pode acarretar o aparecimento de síndromes ou morte embrionária (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Figura 19- A: Óocitos com células *cumulus oophorus* compactadas **B:** Óocitos com células do *cumulus oophorus* expandidas.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

No laboratório, era descongelado meia palheta de sêmen, á 37 °C. Assim que descongelado os espermatozóides eram adicionados a coluna de Percoll previamente montada em um microtubo, onde sua superfície era composta de Percoll 45% e no fundo adicionado Percoll 90% (GONÇALVES *et al.*, 2008) (Figura 20 A). Em seguida eram levados para centrifugar a 603 G por 7 minutos. Após este período, os espermatozóides vivos e móveis, formavam um “pellet” no fundo do microtubo, enquanto que os mortos ficavam no sobrenadante. O sobrenadante era retirado com uma pipeta e descartado, e o “pellet” adicionado em um microtubo apenas com o meio FIV, e levado para centrifugar a 603 G por 3 minutos para lavá-los.

Após a lavagem dos espermatozóides, 2µL de sêmen eram dissolvidos em 18 microlitros de água destilada na câmara de Neubauer (Figura 20 B). Em uma lupa contava-se todos os espermatozóides presentes em 5 quadrantes, e a partir do resultado, realizava-se um cálculo utilizando a seguinte fórmula:

$$\mu\text{l de sêmen} = \frac{\text{n}^\circ \text{ espermatozóide} \times 5}{1600}$$

O resultado obtido, era a quantidade de microlitros de sêmen, onde se obtinha 2 milhões de espermatozoides, necessários para fecundar uma gota com 20 óocitos. Geralmente a quantidade de sêmen necessária para fecundar cada gota ficava entre 2 e 4 μL . até que a contagem e o cálculo fossem realizados o sêmen era armazenado em um microtubo na estufa.

Figura 20- **A:** Coluna de Percoll, para seleção de espermatozoides viáveis. **B:** Câmara de Neubauer, usada para fazer a contagem dos espermatozoides.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

Assim que realizado a lavagem dos óocitos em 3 gotas de meio FIV, estes eram transferidos para a placa de FIV. A placa de FIV é montada da mesma maneira que a placa de MIV. No entanto o tamanho de cada gota que forma a placa é de 80 μL . Após a adição dos espermatozoides na gota, a placa era colocada sobre uma “barca”, identificada, e levada para a estufa por um período de 18 horas (ADONA *et al.*, 2008).

3.2.1.5 Cultivo *in vitro* (CIV)

Após as 18 horas da realização da fertilização, era feita à avaliação da placa de FIV, visualmente, através da lupa, observando a presença de células clivadas e células do *cumulus* soltas na gota, que nos indicava que havia acontecido a fecundação, e que os zigotos, poderiam ser transferidos para a placa de cultivo.

A placa usada no cultivo é a mesma usada na MIV, isto para que as células da granulosa que se formaram durante a maturação dos óocitos, possam contribuir para o desenvolvimento

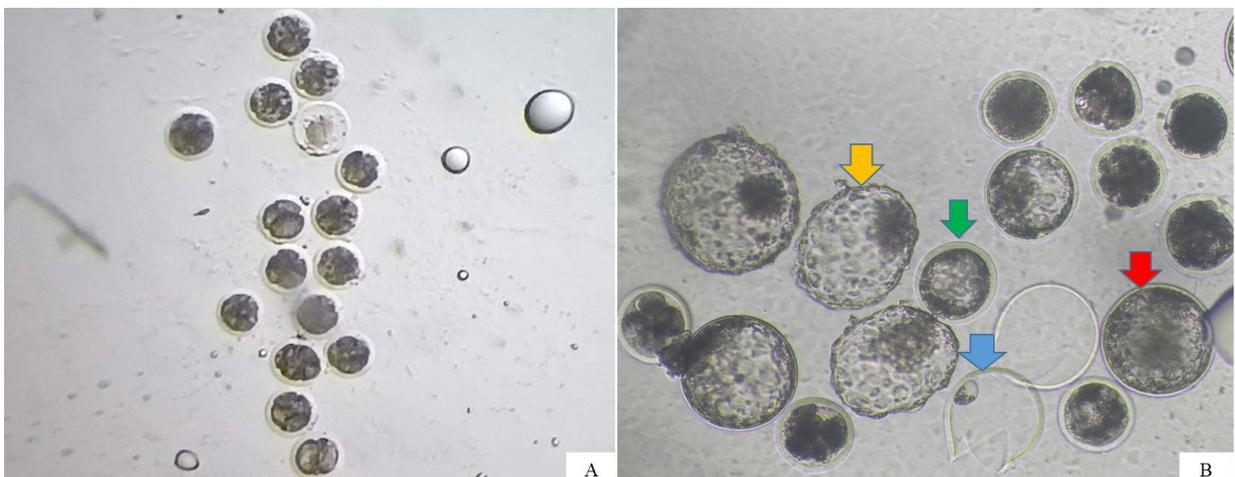
embrionário (COSTA *et al.*, 1997). Para a utilização da placa de MIV, esta era lavada com meio de cultivo com auxílio de uma pipeta. O meio de cultivo era composto de fluido ovidutal sintético (SOF) mais 10% de SFB. Depois de lavada eram colocadas gotas de 40 μ L na placa onde os embriões permaneciam até o dia 7 (D7).

Antes de se realizar a transferência para a placa de CIV, era executado o desnude manual com uma pipeta, para a retirada das células do *cumulus oophorus* ainda existentes nos zigotos. O desnude também poderia ser feito usando um vórtex (ADONA *et al.*, 2017). Por fim, os zigotos eram lavados em 3 gotas de meio de Cultivo e transferido para a placa de CIV devidamente identificada e levada a estufa.

3.2.1.6 Clivagem

Na clivagem, inicia-se a formação de um organismo multicelular (Figura 21 A). Inicialmente, o zigoto com uma única célula sofre diversas divisões mitóticas, passando de 1 a 8 células. Essas células são chamadas de totipotentes, pois são capazes de originarem o indivíduo e os componentes fetais da placenta. Quando o embrião apresenta até 32 células, é denominado mórula (GEISERT; MALAYER, 2004). Depois deste estágio, o embrião sofre blastulação, apresenta um número maior de células, tornando-se blastocisto inicial, blastocisto expandido e blastocisto eclodido respectivamente (Figura 21 B) (GEISERT; MALAYER, 2004). Devido a maior taxa de gestação, para envase é preconizado o blastocisto expandido (GRÁZIA; SANTOS, 2021).

Figura 21- A: Zigotos em fases iniciais de clivagem **B:** Seta verde: blastocisto inicial; Seta vermelha: blastocisto expandido; Seta amarela: blastocisto eclodido; Seta azul: zona pelúcida de um embrião que eclodiu.



Fonte: arquivo pessoal, 2023.

O embrião em fase de blastocisto tem como característica a presença de uma cavidade denominada blastocele; o embrioblasto, que é uma massa celular que será responsável pela formação do feto; e o trofoblasto que dará origem aos componentes da placenta (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Os embriões produzidos durante o período de estágio eram objeto de estudo para fins de pesquisa, portanto após o D7 os mesmos eram armazenados em formaldeído para posteriormente ser realizada a contagem de suas células.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização do estágio proporcionou ao acadêmico uma experiência ampla acerca da atuação do Médico Veterinário, uma vez que foi possível desenvolver atividades práticas: a campo quanto em laboratório na área de reprodução animal, possibilitando experiências novas para o estagiário e ainda agregou mais valor por ter possibilitado a vivência e obtenção de experiências na clínica médica de grandes animais.

REFERÊNCIAS

- ADONA P. R.; PIRES P. R. L.; QUETGLAS M. D.; SCHWARZ K.R.L.; LEAL C. L. V. **Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: Effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development.** São Paulo: Animal Reproduction Science, v.108, n.1, p.49-652, 2008.
- ADONA P.R.; GUEMRA S.; MIRANDA M. S.; QUEIROZ G. R.; SILVA B. L. M. **Biotécnica de produção *in vitro* de embriões bovinos.** Londrina: Editora científica, p1-14, 2017.
- ADONA P.R.; MONZANI P. S.; GUEMRA S.; MIRANDA M. S.; OHASHI. O.M. Ovogênese e Foliculogênese em Mamíferos UNOPAR **Cient Ciênc Biol Saúde**;15(3): p.245-50.2013.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 3 ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.p.79-84.
- COSTA E. P.; VALE FILHO V. R.; NOGUEIRA J. C.; FERREIRA A. M.; GUIMARÃES J. D.; COSTA A. H. A. **Cultivo *in vitro* de ovócitos bovinos em diferentes sistemas: I-efeito na maturação nuclear.** Arq. bras. med. vet. zootec, p. 551-9, 1997.
- DE LOOS, F.; VAN VLIET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, T. A. M. **Morphology of immature bovine oocytes.** Gamete Research, v. 24, n. 2, 1989. p.197–204.
- FERNANDES, G. D. O.; LEAL, D. R.; MOREIRA, N. H.; SILVA, T. A. D. S. N.; RAMOS, A. F.; & NEVES, J. P. **Identificação de bactérias no sêmen de ovinos em diferentes sistemas de criação e o efeito do uso de Kiolol-L®.** Goiânia: Ciência Animal Brasileira, v. 14, p. 332-337, 2013.
- GEISERT R. D.; MALAYER J. R. Implantação *In*: HAFEZ E.S.E.; HAFEZ B. **Reprodução animal.** 7 ed. Barueri: Manole, 2004.p.127-140.
- GILCHRIST R. B.; THOMPSON J. G.; **Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*.** Austrália: Theriogenology 67, p. 6–15, 2007.
- GONÇALVES, Paulo Bayard Dias.; OLIVEIRA, Marcos Antônio Lemos.; MEZZALIRA, Alceu.; MONTAGNER, Marcelo Marcos.; VISINTIN, José Antônio.; COSTA, Luís Fabiano Santos. Produção *in vitro* de embriões *In*: GONÇALVES, Paulo Bayard Dias.; FIGUEIREDO.; José Ricardo.; FREITAS, Vicente José de Figueirêdo. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal.** 2 ed. São Paulo: Roca, 2008.p.261--584.
- GRÁZIA J. G. V.; SANTOS G. M. **Avaliação do estágio de desenvolvimento embrionário na taxa de prenhez em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*.** Curitiba: brazilian Journal of Animal and Environmental Research. v.4, n.3, p.4776-4782, 2021.
- HAFEZ E.S.E.; HAFEZ. Fertilização e clivagem. *In*: HAFEZ E.S.E.; HAFEZ B. **Reprodução animal.** 7 ed. Barueri: Manole, 2004.p.111-126.
- NOGUEIRA, E.; MINGOTI, G. Z.; NICACIO, A. C. **Melhoramento genético aplicado em gado de corte:** Programa Geneplus-Embrapa. Brasília, DF: Embrapa; Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2013. Capítulo 16. p. 195-211.Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/980600>. Acesso em: 13 jun. 2023.

SARTORI, R.; DODE, M. A. N.; RUMPF, R. Produção *in vivo* e *in vitro* de embriões, bovinos
In: PIRES, Alexandre Vaz. **Bovinocultura de corte**: Volume 1. 1 ed. Piracicaba: FEALQ,
2010. p.561-584.