

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LAVRAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Produção *in vitro* de embriões bovinos

ARIANE RIBEIRO DE ALVARENGA

LAVRAS - MG
2024

ARIANE RIBEIRO DE ALVARENGA

Produção *in vitro* de embriões bovinos

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro Universitário de Lavras, como parte das exigências para a obtenção de título de bacharel em Medicina Veterinária.

ORIENTADOR

Prof. Dr. Ivam Moreira de Oliveira Júnior

LAVRAS - MG

2024

Ficha Catalográfica preparada pelo Setor de Processamento
Técnico da Biblioteca Central do UNILAVRAS

A473p Alvarenga, Ariane Ribeiro de.
 Produção *in vitro* de embriões bovinos / Ariane Ribeiro de Alvarenga.
 – Lavras: Unilavras, 2024.

 28f. : il.

 Portfólio acadêmico (Graduação em Medicina Veterinária) – Unilavras,
 Lavras, 2024.

 Orientador: Prof. Ivam Moreira de Oliveira Júnior.

 1. Bovinos. 2. Oócitos. 3. Reprodução. I. Oliveira Júnior, Ivam Moreira de.
 (Orient.). II. Título.

ARIANE RIBEIRO DE ALVARENGA

Produção *in vitro* de embriões bovinos

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro Universitário de Lavras, como parte das exigências para a obtenção de título de bacharel em Medicina Veterinária.

Aprovado em / /

ORIENTADOR
Prof. Dr. Ivam Moreira de Oliveira Júnior

LAVRAS - MG
2024

Dedico este trabalho aos meus pais por me proporcionar a oportunidade de estudar e a todos que sempre estiveram junto comigo nessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus pela dádiva da minha existência.

Manifesto minha gratidão à minha mãe, Eliane, que sempre esteve ao meu lado, proporcionando-me força e apoio. Ao meu pai, Antonio, agradeço por seu incentivo e por tornar este sonho possível.

Não posso deixar de expressar meu reconhecimento aos meus irmãos, Eduardo e Antônio, os quais nunca duvidaram de mim. Também sou grata à minha afilhada, Ana Klara, que foi uma fonte de luz em minha jornada.

Às minhas amigas Amaryllis, Ana Luiza, Alana, Bruna, Fabiana, Fernanda, Juliana e Marina, que de forma constante, estiveram presentes, o meu sincero agradecimento.

Ao Sérgio, que compartilhou comigo tanto os bons, quanto os maus momentos, fornecendo apoio inestimável, a minha profunda gratidão.

À minha avó, Maria Aparecida, que dedicou suas preces por mim todos os dias, agradeço do fundo do coração.

Ao meu orientador, Ivam, por todo suporte durante essa jornada.

Por fim, agradeço a toda a minha família, que torceu por mim de maneira incansável.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Augusto Cury

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1 – Vacas no tronco de contenção	11
Imagem 2 – Ferramentas para aspiração folicular	12
Imagem 3 – Seleção dos oócitos	13
Imagem 4 – Cultura <i>in vitro</i> dos embriões	14
Imagem 5 – Embriões bovinos produzidos a partir de oócitos maturados, fecundados e cultivados <i>in vitro</i>	15

LISTA DE SIGLAS

CCO - Células complexos cumulus-oócito

CIV – Cultivo *in vitro*

FIV – Fertilização *in vitro*

GEPPOA – Grupo de Estudos em Produção e Produtos de Origem Animal

GERE – Grupo de Estudos em Reprodução

GVBD - Quebra da vesícula germinativa

MG – Minas Gerais

MIV – Maturação *in vitro*

mL - mililitro

mmHg - Milímetros de mercúrio

OPU - *Ovum Pick Up* ou aspiração folicular

PBS - Tampão fosfato-salino ou phosphate buffered saline

PIV – Produção *in vitro*

UFLA – Universidade Federal de Lavras

UNIFENAS - Universidade José do Rosário Vellano

UNILAVRAS – Centro Universitário de Lavras

ZP – Zona pelúcida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. DESENVOLVIMENTO.....	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
4. CONCLUSÃO.....	23
5. REFERÊNCIAS.....	23

1. INTRODUÇÃO

Finalizei o ensino médio no ano de 2017 no Colégio Minas Austral, em Itanhandu – MG, logo em seguida iniciei minha graduação em Medicina Veterinária na Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, onde cursei o primeiro período em 2018. No segundo semestre de 2018, transferi-me para o Centro Universitário de Lavras – UNILAVRAS. No segundo semestre de 2020, em meio a pandemia do Coronavírus, comecei a cursar Zootecnia simultaneamente na Universidade Federal de Lavras – UFLA, onde desde então faço parte do Grupo de Estudos em Reprodução - GERE.

Desde o início de minha jornada na Medicina Veterinária, tive o interesse em cursar Zootecnia para me tornar uma profissional completa. Quando defini a minha futura área de atuação, a reprodução, decidi ingressar no curso de Zootecnia para aprofundar meu conhecimento no assunto. Para complementar minha formação, integrei-me ao GERE, onde acompanho diversos casos reprodutivos e de emergência.

O estágio supervisionado foi dividido em duas partes, sendo uma delas realizada em uma fazenda leiteira de alta produção na região de Pouso Alto-MG, e a outra parte em uma propriedade na zona rural de Lavras-MG.

O objetivo geral do estágio foi compreender a rotina de uma fazenda leiteira de alta produção e auxiliar nos manejos reprodutivos e sanitários. Como objetivo específico, busquei contribuir para a produção *in vitro* de embriões (PIV).

A realização do estágio foi de grande importância para ampliar meus conhecimentos na reprodução bovina, principalmente na área laboratorial, na qual pretendo seguir profissionalmente.

2. DESENVOLVIMENTO

O procedimento descrito abaixo foi realizado sob orientação de um profissional Médico Veterinário em uma propriedade rural no município de Pouso Alto – MG, era uma fazenda leiteira de alta produção, a produção média era de 37.000kg litros de leite. A fazenda é dividida em alguns setores como bezerreiro, recria, pré-parto, pós-parto, sanidade, reprodução, vacas em lactação e ordenha.

Durante meu estágio passei uma semana em cada setor e no setor de reprodução acompanhei a aspiração folicular (*Ovum Pick Up* - OPU) em fêmeas bovinas para produção *in vitro* de embriões. A imagem 1 mostra vacas holandesas, que foram previamente selecionadas, de acordo com sua genética, ECC e produção leiteira, no tronco de contenção aguardando para a aspiração folicular, que é a primeira etapa da PIV.

Imagem 1 – Vacas no tronco de contenção.



Fonte: Própria autoria (2023)

A imagem 2 exhibe todas as ferramentas necessárias para a aspiração folicular, incluindo um equipamento de ultrassom com um transdutor microconvexo acoplado a uma guia de aspiração, que possui uma agulha em sua extremidade, além de uma bomba a vácuo. A pressão de vácuo é controlada por essa bomba ajustada entre 60 e 80 mmHg, que direcionará os oócitos para um tubo Falcon de 50 mL, que será levado para o laboratório logo em seguida da coleta para que possa ser analisado.

Imagem 2 – Ferramentas para aspiração folicular.



Fonte: Própria autoria (2023)

Na imagem 3, a técnica do laboratório faz a seleção dos oócitos aptos para que possam ser colocados em meio de maturação *in vitro* (MIV), preparado adequadamente para suplementar as células oocitárias, onde ficarão por cerca de dezoito a vinte e duas horas e então serão fertilizados com espermatozoides previamente selecionados.

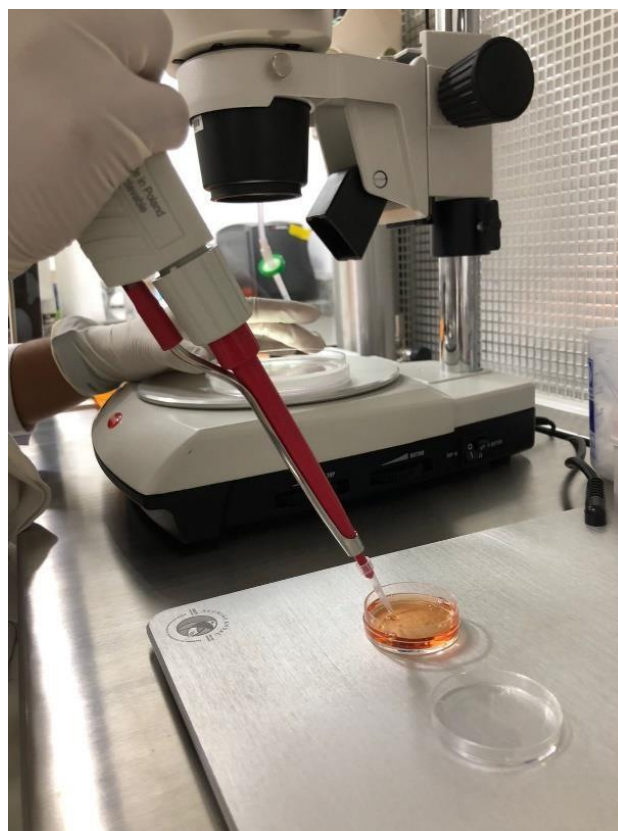
Imagem 3 – Seleção dos oócitos.



Fonte: Própria autoria (2023)

A imagem 4 retrata o processo de cultura *in vitro* (CIV) em andamento, esse processo acontece depois da fertilização *in vitro*. Na CIV os embriões prosseguem em seu desenvolvimento por um período de sete dias em um meio de cultura que simula as condições uterinas.

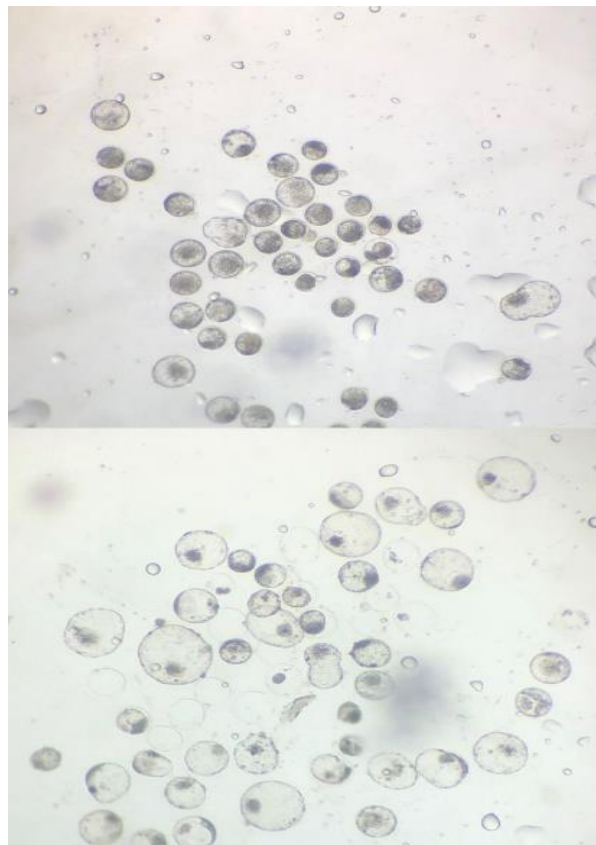
Imagem 4 – Cultura *in vitro* dos embriões.



Fonte: Própria autoria (2023)

Na imagem 5, podemos observar mórulas e blastocistos, indicando que o processo foi bem-sucedido. Após esse período de sete dias, o embrião estará pronto para ser transferido para o útero de fêmeas receptoras. Esse embrião será transferido para uma palheta dentro de um aplicador, o qual será posicionado na cérvix do animal e depositado, dessa forma, a vaca receptora levará a gestação adiante.

Imagem 5 – Embriões bovinos produzidos a partir de oócitos maturados, fecundados e cultivados *in vitro*.



Fonte: Própria autoria (2023)

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Production of bovine embryos *in vitro*

Ariane Ribeiro de Alvarenga¹

¹ Estudante de Medicina Veterinária, Unilavras, Lavras-MG, Brasil

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma técnica muito importante na reprodução assistida de mamíferos domésticos, proporcionando uma alternativa valiosa para acelerar a produção de animais geneticamente superiores. Iniciando com a coleta de oócitos imaturos através de aspiração folicular ou Ovum pick-up (OPU), a PIV passa por fases sequenciais, incluindo maturação *in vitro* (MIV) e fertilização *in vitro* (FIV) em condições controladas de laboratório. Essa abordagem se destaca por sua aplicação em fêmeas que enfrentam desafios à reprodução natural, oferecendo uma solução viável. O cultivo *in vitro* precede a implantação embrionária, apresentando algumas limitações, como embriões de qualidade inferior comparados aos gerados *in vivo*. Apesar dos notáveis avanços, há a necessidade de pesquisas adicionais para aprimorar as fases críticas da PIV, especialmente nas áreas de maturação e cultivo, visando melhorar os índices de prenhez em condições de campo. Reduzir custos operacionais é um objetivo importante para viabilizar uma disseminação mais ampla dessa tecnologia, contribuindo assim para o aumento da produtividade na pecuária nacional. Em resumo, a PIV é uma ferramenta poderosa na reprodução assistida, com potencial para revolucionar a pecuária através do melhoramento genético. Investir em pesquisa para melhorar a qualidade dos embriões e reduzir custos é essencial para ampliar seu uso e aumentar a produtividade.

Palavras-chave: Bovinos. Oócitos. Reprodução.

ABSTRACT

In vitro embryo production (IVP) is a very important technique in assisted reproduction for domestic mammals, providing a valuable alternative to expedite the production of genetically superior animals. Beginning with the collection of immature oocytes through follicular aspiration or Ovum pick-up (OPU), IVP progresses through sequential phases, including *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* fertilization (IVF) under controlled laboratory conditions. This approach stands out for its application in females facing challenges to natural reproduction, offering a viable solution. *In vitro* cultivation precedes embryonic implantation, presenting some limitations such as embryos of inferior quality compared to those generated *in vivo*. Despite notable advancements, additional research is needed to refine critical phases of IVP, particularly in maturation and cultivation, aiming to improve pregnancy rates under field conditions. Reducing operational costs is a key objective to enable wider dissemination of this technology, thereby contributing to increased productivity in national livestock. In summary, IVP is a powerful tool in assisted reproduction with the potential to revolutionize livestock through genetic improvement. Investing in research to enhance embryo quality and reduce costs is essential for expanding its use and boosting productivity.

Keywords: Bovines. Oocytes. Reproduction.

Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIV) representa uma significativa biotécnica de reprodução assistida aplicável a mamíferos domésticos de interesse econômico (MELLO, 2016). Essa abordagem pode ser empregada como uma alternativa para acelerar a produção de animais superiores a nível genético e evitar o descarte prematuro de fêmeas que apresentam condições adquiridas que as impedem de se reproduzir de forma natural ou por meio da transferência de embriões (TE) (GONÇALVES et al., 2007).

A PIV vem apresentando avanços consideráveis e está sendo lentamente incorporada aos projetos de produção (RUMPF, 2007). Com o desenvolvimento do método de punção folicular, tornou-se possível a recuperação de oócitos de fêmeas vivas para fecundação *in vitro* (FIV), abrindo novos caminhos para multiplicação de animais de

interesse econômico superando os atuais índices da TE clássica, no que diz respeito à produção de bezerro por vaca por ano (RUMPF, 2007).

A evolução e a ampliação do uso das biotecnologias relacionadas à reprodução animal, como a TE e a FIV, têm desempenhado um papel crucial no aprimoramento da eficiência reprodutiva dos rebanhos bovinos. A PIVE envolve a manipulação dos gametas, replicando em ambiente laboratorial os processos fisiológicos naturais que ocorrem nas fêmeas (SCANAVEZ et al, 2013). As fases da PIVE compreendem a coleta de oócitos imaturos, maturação *in vitro*, fecundação *in vitro* e cultivo *in vitro*.

Fases da produção *in vitro* de embriões

A primeira fase do processo de produção de embriões bovinos *in vitro* envolve a obtenção dos oócitos, através de aspiração folicular, ovários obtidos em abatedouro ou “slicing” (BORGES, 2008). Em seguida, a técnica se desdobra em três etapas: maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) até atingir o estágio de mórula e blastocisto, geralmente alcançado no sétimo dia após a fecundação (OLIVEIRA; SARAPIÃO; QUINTÃO, 2014).

Neste ponto, os embriões estão prontos para serem transferidos ou criopreservados em botijões de nitrogênio, no qual estão em uma temperatura de -196°C com nível mínimo de 15mL de nitrogênio (OLIVEIRA, 2013). Todas essas etapas estão interligadas e são realizadas em uma infraestrutura adequada em um laboratório de reprodução (OLIVEIRA; SARAPIÃO; QUINTÃO, 2014).

Coleta de oócitos imaturos

A fase inicial da PIV envolve a obtenção de oócitos, sendo a técnica mais amplamente utilizada para a obtenção *in vivo* conhecida como aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom, ou Ovum Pick-Up (OPU) (VARAGO et al., 2008). Desenvolvida para proporcionar uma abordagem menos invasiva na coleta de

complexos cumulus-oócito (CCO), que são uma das classes das células da granulosa que envolvem o oócito, mesmo durante a ovulação, (CCO) em comparação com procedimentos cirúrgicos anteriores, a técnica de OPU oferece diversos benefícios (GALLI et al., 1996).

A OPU é menos traumática e aplicável em qualquer fase do ciclo estral, permitindo a coleta de oócitos em fêmeas a partir de 6 meses de idade, em fêmeas idosas, animais pré-púberes e aqueles em estágios iniciais de gestação até o terceiro mês (OLIVEIRA; SARAPIÃO; QUINTÃO, 2014). Além disso, é possível realizar a coleta entre a segunda e terceira semanas pós-parto (GALLI et al., 1996).

Conforme descrito por Gonçalves et al. (2008), a coleta de oócitos em fêmeas bovinas é conduzida por meio de punção folicular utilizando uma agulha acoplada a uma sonda transvaginal. Durante esse procedimento, os folículos destinados à punção são visualizados na tela do ultrassom. Os oócitos aspirados desses folículos devem apresentar um diâmetro situado entre 2 e 8 mm. Folículos com diâmetro inferior a 2 mm não são capazes de reiniciar a meiose, enquanto aqueles que ultrapassam os 8 mm geralmente estão em processo de atresia durante a maturação, tornando ambas as situações inviáveis (OLIVEIRA; SARAPIÃO; QUINTÃO, 2014).

Além da agulha, sonda transvaginal e do ultrassom, um sistema de bomba a vácuo facilita a recuperação dos oócitos e do líquido folicular, direcionando-os para um tubo coletor (GONÇALVES et al., 2008). Posteriormente, realiza-se a seleção com base em características dos CCO e na aparência do citoplasma do oócito. Esses oócitos são classificados de acordo com sua morfologia em graus de I a III, sendo I considerado ótimo, II bom e III regular, além de citoplasma irregular e degenerado, levando em conta sua qualidade e estrutura, essa classificação pode ser variável de acordo com as normas do laboratório (PALMA, 2018). Os oócitos selecionados são, então, transportados para o laboratório, marcando o início da fase de maturação oocitária *in vitro* (VARAGO et al., 2008).

Maturação *in vitro*

Após a aspiração dos oócitos dos folículos ovarianos, eles não estão imediatamente prontos para a fecundação, requerendo um processo de transformações no núcleo e no citoplasma denominado maturação oocitária (GALLI et al., 2003). Em condições naturais, a maturação tem início logo após o pico pré-ovulatório de LH (BUENO, 2008). No contexto da aspiração folicular, esse processo se inicia com a retirada do oócito do interior do folículo ovariano (HOSHI, 2003). A maturação nuclear em bovinos, passando do estágio de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica para o estágio de metáfase II, requer aproximadamente 18 a 22 horas (THOMPSON, 2000).

Diversos métodos foram experimentados na MIV em bovinos, sendo que a maioria dos laboratórios preferiu suplementar o meio de maturação com soro fetal bovino (SFB) e gonadotrofinas (FSH, LH e estradiol), em condições controladas (RODRIGUES; GARCIA, 2000)

Segundo estudos de Gonçalves et al. (2007) e Varago et al. (2008), em adição ao meio de maturação, é imprescindível a presença de uma estufa que proporcione uma atmosfera gasosa e temperatura controladas e adequadas. O período de maturação varia de 18 a 24 horas em uma atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. Após esse período, os oócitos fazem a expulsão do primeiro corpúsculo polar e estão prontos para a fecundação (MELLO et al., 2016).

Fertilização *in vitro*

A fecundação é o processo no qual o espermatozoide entra em contato com o oócito, resultando na formação do zigoto, que posteriormente se desenvolve até o estágio de blastocisto (DE SOUZA, 2019). No processo *in vitro*, para que todo esse procedimento ocorra, os meios e os protocolos utilizados precisam proporcionar um ambiente propício. Esse ambiente deve permitir o metabolismo dos oócitos e células do

cumulus, ao mesmo tempo que mantém a função espermática eficiente para a ocorrência da fecundação (PALMA, 2018).

O meio mais comumente utilizado para a fecundação *in vitro* é o FERT-TALP, que inclui elementos como a heparina, reconhecida por suas propriedades de promoção da capacitação espermática (ASSUMPÇÃO et al., 2002). Essa formulação também incorpora componentes importantes para a motilidade e sustentação do gameta masculino, tais como epinefrina, hipotaurina e penicilamina. (IRITANI & NIWA, 1977).

O co-cultivo, que consiste na interação entre espermatozoide e oócito, ocorre por um período de 18 a 22 horas, em uma temperatura de 39°C, sob uma atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (MELLO et al., 2016). Antes de serem co-cultivados com os oócitos, os espermatozoides viáveis, provenientes de uma palheta de sêmen, necessitam ser separados do plasma seminal, crioprotetores, extensores e espermatozoides não viáveis (PEIXER, 2018). Para bovinos, os métodos mais usuais de separação espermática incluem o gradiente de PERCOLL e o swim-up. Após a separação, os espermatozoides são diluídos para atingir uma concentração final de 1 a 5 x 10⁶ espermatozoides viáveis/mL de meio (GONÇALVES et al., 2007).

Cultivo *in vitro*

O intervalo que precede a implantação embrionária é caracterizado por eventos fundamentais, como a clivagem, ativação do genoma embrionário, compactação dos blastômeros, diferenciação do trofoblasto e embrioblasto, formação e expansão do blastocele, além da ruptura da zona pelúcida (ZP) (LONERGAN et al., 1999). Segundo Memili & First (2000), esses fenômenos podem ser alcançados de diversas maneiras no decorrer do CIV, sendo o ponto fundamental do desenvolvimento a ativação do genoma embrionário, que geralmente ocorre por volta da fase de 8 a 16 células.

A qualidade dos embriões produzidos *in vitro* normalmente é mais baixa quando comparada a qualidade dos embriões gerados *in vivo* (SILVA, 2017). Esses embriões também apresentam uma zona pelúcida mais fraca, um índice elevado de alterações dos

cromossomos (SLIMANE et al., 2000), além de falta de compactação na massa celular, formação antecipada da blastocela, alteração na relação de massa celular interna em relação às células trofoblásticas, juntamente com mudanças na expressão gênica e no metabolismo celular (LONERGAN et al., 2006).

Como dito por Mello (2016), o CIV também necessita de um ambiente apropriado, com controle preciso de tempo, atmosfera e temperatura. Portanto, o tempo de CIV varia geralmente de 7 a 9 dias, dependendo dos objetivos da rotina da PIV, mantido a uma temperatura de 39°C com atmosfera controlada (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) e umidade saturada (OLIVEIRA et al, 2014). Durante esse processo, a taxa de formação de blastocistos é tipicamente avaliada no sétimo dia de cultivo (MELLO et al.,2016).

Os blastocistos gerados podem então permanecer na estufa de cultivo até o nono dia para que a taxa de eclosão *in vitro* seja avaliada (MELLO et al.,2016). Após a conclusão dessas fases, até o quinto dia há uma espera adicional de 48 horas, que representa o momento do segundo ciclo de alimentação. No sexto dia, ocorre a fase de preparação, e no sétimo dia, os embriões são retirados para serem destinados ao envase fresco ou ao processo de congelamento (OLIVEIRA et al, 2014).

Considerações finais

A aplicação da produção *in vitro* de embriões representa um avanço significativo no potencial reprodutivo de fêmeas de alto valor genético. Além disso, possibilitou a reprodução de animais portadores de infertilidade adquirida que, de outra forma, estariam destinados ao abate devido à sua incapacidade de gerar descendentes. A produção *in vitro* de embriões é amplamente reconhecida quanto aos diferentes aspectos de suas etapas, e nos últimos anos, diversas pesquisas têm sido realizadas para aprimorar os processos de maturação, fecundação e cultivo.

Apesar dos avanços significativos e do investimento elevado, há a necessidade de realizar mais estudos para aprimorar as etapas críticas da PIV, especialmente as fases de maturação e cultivo, visando a melhoria dos índices de prenhez em condições

de campo. O contínuo aprimoramento da técnica, com a produção de embriões de alta qualidade em números cada vez mais expressivos, aliado à redução de desafios que limitaram sua aplicação em escala comercial, certamente contribuirá para a diminuição do custo operacional da produção *in vitro*. Considerando que custos elevados estão associados aos materiais e equipamentos necessários, deve-se romper essas barreiras possibilitando a disseminação mais ampla dessa tecnologia, visando o aumento da produtividade na pecuária nacional.

4. CONCLUSÃO

Concluí meu portfólio, onde pude alcançar os objetivos de aprofundar meus conhecimentos em produção *in vitro* de embriões bovinos. Tive a oportunidade de unir conhecimento prático e teórico, ampliando meu aprendizado na área de reprodução animal bovina. Pude também pesquisar em vários artigos de diversos autores com opiniões distintas para cada etapa da PIV.

Durante essa vivência consegui aprimorar meus conhecimentos práticos, principalmente no ramo da reprodução animal, aprendi a trabalhar melhor em grupo, a ter melhor diálogo com o proprietário, ser mais responsável, estar sempre pronta para novos desafios e ser mais confiante em mim. Foi de suma importância para que minha formação se tornasse mais completa.

5. REFERÊNCIAS

ASSUMPÇÃO, Mayra Elena Ortiz D'Avila *et al.* Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science**, [S.L.], v. 39, n. 3, p. 149-156, 2002. Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-95962002000300008>.

BORGES, Markis S. M. **Produção in vitro de embriões bovinos**. 2008. Tese (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Goiás, Campus Jataí, 2008.

BUENO, Ataliba Perina; BELTRAN, Maria Paula. Produção in vitro de embriões bovinos. **Revista Científica Eletônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 11, n. 4, jul. 2008. Semestral.

DE SOUZA, N. S. et al. **Produção in vitro de embriões bovinos: etapas de produção e histórico no Brasil**. Ciência Veterinária UniFil, v. 1, n. 3, p. 95-108, 2019.

GALLI, C., DUCHI, R., CROTII, G. et al. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p. 599-616, 2003.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects 01IVM-IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.371-379, 1996.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2008.

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, v.31, p. 212-217, 2007.

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

IRITANI A, NIWA K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle

follicular oocytes matured in culture. **Journal Reproduction Fertility and Development**, v.50, p.119-121, 1977.

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

LONERGAN P, Carolan C, Van Langendonck A, Donnay I, Khatir H, Mermillod P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. **Bio Reprod**, v.54, p.1420-1429, 1996.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A. C. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 137-152, 2006.

MARIANO, Renata Sitta Gomes. **ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM RUMINANTES – REVISÃO DE LITERATURA.** Disponível em: <file:///C:/Users/Samsung/Downloads/898Texto%20do%20artigo-4032-1-10-20151216.pdf>. Acesso em: 08 out. 2023.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte- MG, v.40, n.2, p.58-64, 2016 Disponível em: [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v40/n2/p58-64%20\(RB602\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v40/n2/p58-64%20(RB602).pdf) Acesso em 08 out. 2023;

MEMILI, E.; FIRST, N. L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**, v. 8, p. 87-96, 2000.

OLIVEIRA, Andréa. **Inseminação artificial em bovinos: botijão de nitrogênio**. 2013. Disponível em: <https://www.cpt.com.br/artigos/inseminacao-artificial-em-bovinos-botijao-de-nitrogenio>. Acesso em: 08 out. 2023.

OLIVEIRA, Clara Slade; SARAPIÃO, Raquel Varella; QUINTÃO, Carolina Capobiango Romano. **Biotécnicas da Reprodução em Bovinos**: minicursos ministrados durante o 3º simpósio “Biotécnicas da reprodução em bovino” no laboratório de reprodução animal do campo experimental Santa Mônica. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2014. 52 p.

PALMA, G. A. Producción in vitro de embriones bovinos. **Biología de La reproducción**. 2. ed. Mar del Plata - Argentina, p 313-380, 2018.

PEIXER, Patrícia Fernanda; SANTOS, Klayto José Gonçalves dos. Produção in vitro de embriões bovinos. **Espacios**, São Luís de Montes Belos, v. 16, n. 39, p. 2-17, jan. 2018. Disponível em: <https://www.revistaespacios.com/a18v39n16/a18v39n16p02.pdf>. Acesso em: 08 out. 2023.

RODRIGUES, C.F.M., GARCIA, J.M. Fecundação in vitro em bovinos: aplicação comercial. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS Supl.**, v.28, p.186-187, 2000.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p. 229-233, 2007.

SCANAVEZ, A. L.; CAMPOS, C. C.; SANTOS, R. M. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 65, n. 3, p. 722-728, 2013.

SILVA, R. R. et al. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte. In: **Colloquium Agrariae**. 2017. p. 402-415.

SLIMANE, W.; VAIMAN, D.; GODARD, S.; VAIMAN, A.; CRIBIU, E.; RENARD, J. P. A repetitive probe for FISH analysis of bovine interfase nuclei. **Genet. Sel. Evol.**, v. 32, p. 217-225, 2000.

THOMPSON, J.G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.263-275, 2000.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 36, p. 100-109, 2008.