



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E VETERINÁRIA

FERNANDA FERREIRA GOUVEIA

A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS.

**Monografia apresentada para conclusão do
curso de Medicina Veterinária da Faculdade
de Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília**

**Brasília-DF
Julho de 2011**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E VETERINÁRIA

FERNANDA FERREIRA GOUVEIA

A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS.

Monografia apresentada para conclusão do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Orientador

Prof. Dr. Jairo Pereira Neves

Brasília-DF
Julho de 2011

Ficha Catalográfica

Gouveia, Fernanda Ferreira

A Produção *in vitro* de embriões Bovinos. /Fernanda Ferreira Gouveia; Orientação do Professor Doutor Jairo Pereira Neves. Brasília-DF, 2011.

35p.:Il.

Monografia - Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Veterinária, 2011

1. Bovinos. 2. Embriões. 3. Produção *in vitro*. I. Neves. J. P. II. Título.

Cessão de direitos

Nome do Autor; Fernanda Ferreira Gouveia

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Produção *in vitro* de embriões Bovinos

Ano: 2011

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Fernanda Ferreira Gouveia

012.241.051-33

QI 31 Iote 09 Edifício Rio Verde apto 108 Guará II

71065-905 Brasília-DF Brasil

(061) 8169-1915 fernandavetunb@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: GOUVEIA, Fernanda Ferreira

Título: A Produção *in vitro* de embriões Bovinos.

Monografia de conclusão do Curso de Medicina Veterinária apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. Jairo Pereira Neves

Instituição: UnB

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Ivo Pivato

Instituição: UnB

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

Instituição: UnB

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedico este trabalho ao meu pai Edival que, de algum lugar, está muito feliz vendo meu esforço e minha paixão pela Medicina Veterinária e pelo campo, e me apoiando. E à Deus por sempre me iluminar e pelas oportunidades que tem me dado, pois sem Ele nada seria possível.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela dádiva da vida e por me abençoar com tantas graças.

À todos aquele que acreditaram e que acreditam em meu sucesso e felicidade na profissão por mim escolhida.

À minha família, principalmente minha mãe e meu irmão, que amo tanto e que me incentivaram em todos os momentos dessa minha jornada e para que este momento fosse possível.

Ao meu querido professor e orientador Dr. Jairo Pereira Neves pela confiança, oportunidade de aprendizado e apoio. Com certeza é uma das pessoas em que me espelho para ser uma boa profissional.

Ao médico veterinário Wanderley pelo entusiasmo ao dividir comigo o seu conhecimento, pela paciência ao atender meus telefonemas para tirar minhas dúvidas, e claro pela sua amizade.

Aos pesquisadores Prof. Dr. Fabiano Alvim, Prof. Dr. Rodrigo Vidal, Prof. Dr. Alexandre Floriani, Prof. Dr. Mauricio Fernandes, a toda a equipe da EMBRAPA Sucupira e a todos da empresa Cal Sete, pelas oportunidades de estágios e pesquisas que me proporcionaram e por confiarem em meu trabalho.

Aos meus queridos amigos Daniel, Japão, Juliana Leite, João, Ricardo, Alemão, Capiau, Zé Francisco, Jhayson, Diego Biroca, Vadinho e Rubinho, que trouxeram alegria ao meu estágio curricular, vocês foram e serão muito importantes para minha formação profissional e pessoal, guardo todos com muito carinho em meu coração.

Aos meus queridos primos e primas, minhas amigas Nina e Ju que acreditam nesse meu sonho e que participam dessa minha “vida de veterinário”.

RESUMO

Gouveia, F. F. A Produção *in vitro* de embriões Bovinos. (Bovine embryo *in Vitro* Production). 2011. 35 p. Monografia. (Conclusão do curso de Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A produção *in vitro* de embriões (PIVe) bovinos deve ser vista como mais uma alternativa a ser introduzida nos programas de reprodução assistida, pois, além de sua relevância para estudos biotecnológicos possui fundamento comercial. O Brasil hoje ocupa uma posição de destaque no cenário mundial com consequente reconhecimento internacional, sendo responsável por quase 50% da produção mundial de embriões *in vitro*. A PIVe envolve não só as etapas realizadas no laboratório como: a maturação (MIV) e fecundação (FIV) de oócitos, bem como cultivo ou co-cultivo (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias, mas também a avaliação ginecológica e a sincronização das doadoras e receptoras, diagnóstico precoce de gestação, perdas embrionárias e sexagem fetal, com o uso da ultrassonografia. A responsabilidade e atenção ao executar estes procedimentos é que vão ditar os resultados da técnica.

Unitermos: bovinos, comercial, embriões, PIVe, ultrassonografia.

ABSTRACT

Gouveia, F. F. A Produção *in vitro* de embriões bovinos (Bovine embryo *in Vitro* Production). 2011. 35 p. Monografia. (Conclusão do curso de Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF

The Bovine embryo *in vitro* production must be seen as one more alternative to be introduced in the assisted reproduction programs. It has relevance to biotechnologies studies and it has been used commercially. Nowadays Brazil occupies a prominent position on the world stage with subsequent international recognition, accounting for almost 50% of world embryos *in vitro* production. PIVe involves not only the steps performed in the laboratory as: maturation (IVM) and fertilization (IVF) of oocytes, as well as cultivation or co-culture (IVC) of zygotes and embryonic structures, but also reproductive tract evaluation and synchronization of embryo donors and recipients, early diagnosis of pregnancy and embryonic death and fetal sexing, with the use of ultrasonography. And the responsibility and care when performing these procedures will influence the results of the technique.

Keywords: bovine, commercially, embryos, *in vitro* production, Ultrasonography.

Lista de abreviações e siglas

BE – Blastocisto eclodido
BI – Blastocisto inicial
BL – Blastocisto
BSA – Albumina bovina sérica
BX – Blastocisto expandido
CL – Corpo lúteo
CCO – Complexo cumulus oócito
FIV – Fertilização *in Vitro*
FSH – Hormônio Folículo estimulante
IATF – Inseminação Artificial em tempo fixo
LH – Hormônio Luteinizante
PHE - penicilamina, hipotaurina, epinefrina
PIVe – Produção *in vitro* de embriões
SFB – Soro fetal bovino
US – Ultrassom

SUMÁRIO

1.Introdução.....	11
2. A produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	12
2.1. Avaliação ginecológica de doadoras e receptoras.....	12
2.1.1 Avaliação de doadoras de embrião.....	13
2.1.2. Avaliação de receptoras de embrião.....	15
2.2. Aspiração folicular.....	18
2.2.1. Procura dos oócitos.....	19
2.3. Maturação <i>in vitro</i>	20
2.4. Fertilização <i>in vitro</i>	20
2.4.1. A escolha do sêmen.....	22
2.5. Cultivo <i>in vitro</i>	22
2.6. Transferência de embriões.....	23
2.7. Diagnóstico precoce de gestação.....	23
2.8. Perdas embrionárias.....	25
2.9. Sexagem Fetal.....	27
3.O controle da qualidade dos laboratórios de FIV.....	31
4. Conclusão.....	32
5. Referências bibliográficas.....	33

1. Introdução

No atual contexto de evolução da produtividade na pecuária nacional, associado às evoluções científicas e tecnológicas, várias biotecnologias ligadas a reprodução animal vem sendo desenvolvidas e aprimoradas com o intuito de aumentar a eficiência reprodutiva, maximizando a produção de animais geneticamente superiores, visando o aproveitamento deste material genético para obtenção do maior número de descendentes, em um curto período de tempo (RENESTO e COELHO, 2004).

Enquanto que em um ciclo estral apenas um oócito se desenvolve até a ovulação, hoje se espera que numerosos oócitos que teriam se degenerado tornem-se embriões com a técnica produção de embriões *in vitro* (PIVe), que está em constante desenvolvimento, alcançou resultados mais estáveis que possibilitaram sua aplicação comercial (MERTON et al, 2003).

Uma das formas de se obter estes oócitos é pela aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (LEIVAS, 2006), em que estes oócitos aspirados serão submetidos a fertilização *in vitro*, e quando desenvolvidos a blastocistos serão transferidos em receptoras. Os oócitos bovinos também podem ser obtidos *in vitro* a partir de punção folicular ou dissecação folicular (quando o número de ovários é reduzido), em ovários provenientes de abatedouros (GONÇALVES et al, 2007).

A PIVe vem sendo gradativamente incorporada nos programas de melhoramento animal como técnica de multiplicação, sendo que seu uso tem aumentando significativamente no país. (NEVES et al, 2010).

Mas esta é uma técnica que ainda exige um alto investimento financeiro, e para melhores resultados é essencial que sejam minimizadas as perdas. Portanto alguns procedimentos, realizados tanto a campo como no laboratório, são necessários para maximizar os resultados da PIVe, tais como: avaliação e manipulação hormonal das doadoras e receptoras, escolha do sêmen, diagnóstico precoce de gestação, perdas embrionárias, sexagem fetal com o uso da ultrassonografia e o controle de qualidade do laboratório.

O objetivo desta revisão bibliográfica é detalhar estes trabalhos realizados a campo e no laboratório e como eles podem influenciar nos resultados da produção *in vitro* de embriões.

2. A produção *in vitro* de embriões bovinos

A PIVe comercial envolve os trabalhos realizados a campo e no laboratório obedecendo a sequência: avaliação de receptoras, avaliação de doadoras, maturação *in vitro*, fertilização *in vitro*, cultivo *in vitro*, transferência de embriões, diagnóstico precoce de gestação e sexagem fetal.

2.1. Avaliação ginecológica de doadoras e receptoras.

A produção de embriões *in vitro* possui extrema importância para aumentar a velocidade de ganho genético do rebanho nacional (RENESTO e COELHO, 2004) , pois aumenta a produção de bezerros por fêmea por unidade de tempo. Mas para um bom resultado é preciso diminuir as perdas e melhorar a eficiência reprodutiva tanto das doadoras como das receptoras.

A nutrição é um importante fator que afeta o desempenho reprodutivo das fêmeas bovinas, por meio de seu efeito na qualidade dos oócitos e embriões, no número de folículos e corpos lúteos e na concentração circulante de hormônios (SARTORI et al, 2010)

Exames ultrassonográficos do trato reprodutivo são de grande importância para determinar se um animal está apto para reprodução, qual a fase do ciclo estral ou se apresenta alguma desordem do trato reprodutivo (GRIFFIN e GINTHER, 2002)

Os folículos são facilmente identificados no monitor, e aparecem em preto, devido a hipoeogenicidade do fluido folicular, que absorve a maior parte das ondas ultrassonográficas. A aparência dos folículos ovarianos na ultrassonografia é mostrada na figura 1. Durante a avaliação, é importante distingui-lo de um vaso sanguíneo, que em um corte transversal é visualizado como um segmento esférico, semelhante a imagem de um folículo (DESCÔTEAUX et al, 2010).

Os resultados da PIVe são influenciados significativamente pela condição reprodutiva das doadoras e receptoras razão pela qual a avaliação ginecológica deverá ser realizada, evitando-se a presença de animais sem condições adequadas para esta técnica.

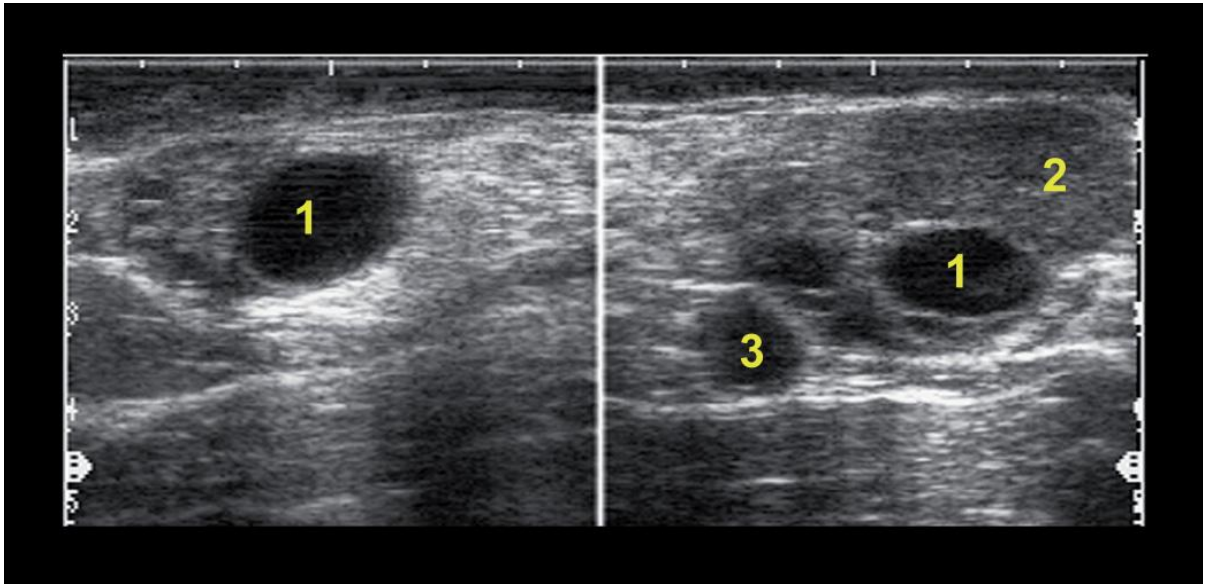


Figura 1: escaneando os ovários esquerdo e o direito (probe de 8MHz) de uma vaca, em que 1: folículo; 2: Corpo lúteo; 3: Vaso sanguíneo (DESCÔTEAUX et al, 2010).

2.1.1. Avaliação de fêmeas doadoras de embrião.

Com o exame ultrassonográfico dos ovários das doadoras pode-se quantificar e qualificar os folículos que estão se desenvolvendo, ou se já houve dominância, ou há alguma alteração significativa, e a partir daí pode-se agendar a aspiração ou iniciar um protocolo hormonal caso necessário.

Ovários inativos (Figura 2) são ovais e têm uma ecogenicidade uniforme que é igual ou ligeiramente melhor que a da cérvix (DESCÔTEAUX et al, 2010).

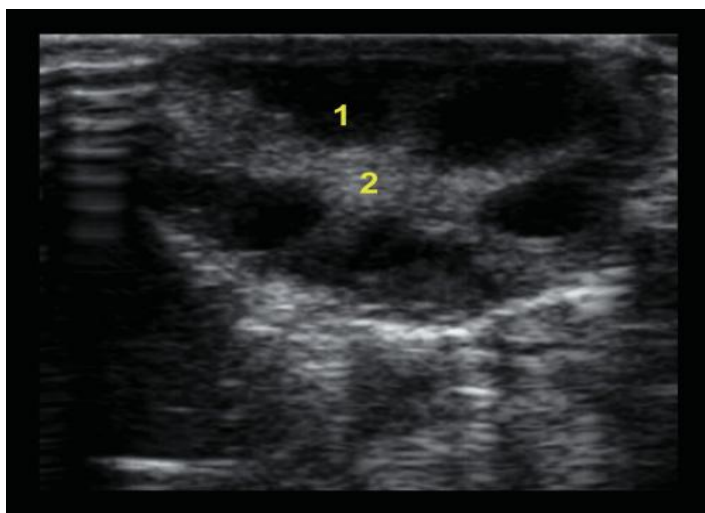


Figura 2: Ultrassonografia de um ovário inativo (probe de 7,5 MHz, profundidade de 2,5 cm). Identificação 1: folículos menores que 4 mm (1) em volta do estroma ovariano; 2: estroma ovariano (DESCÔTEAUX, 2010).

O cisto folicular é a alteração regressiva mais comum do ovário e pode ser causado por fatores estressantes que cursam com elevação da concentração sérica de cortisol (NASCIMENTO e SANTOS, 2003). O cisto ovariano é uma patologia muito comum em vacas doadoras de embrião, visto que estes animais geralmente estão submetidos a situações de estresse: estão confinados, e recebendo dietas com alimentos concentrados e com grande quantidade de carboidratos solúveis.

O diagnóstico do cisto ovariano se baseia associando os achados clínicos à sintomatologia: ninfomania, traduzida pela manifestação de ciclos curtos e irregulares e períodos de aceitação de monta de duração acima do normal e anestro (NASCIMENTO e SANTOS, 2003).

A ultrassonografia é o método clínico mais acurado para o diagnóstico de cistos ovarianos em bovinos (BUENO et al, 2007).

Outra patologia muito comum em doadoras é a mucometra. São causas de mucometra e hidrometra: obstrução do canal cervical ou da vagina, hiperestrogenismo, como nos casos de cisto folicular acompanhado de ninfomania de longa duração (NASCIMENTO e SANTOS, 2003).

Quanto mais precocemente forem diagnosticadas as patologias reprodutivas, mais rápida será a intervenção do veterinário e melhor será o desempenho reprodutivo da propriedade.

Para melhorar a quantidade e qualidade dos oócitos, pode-se iniciar um protocolo hormonal (Dia 0) colocando um implante de progesterona, aplicando 2 ml de benzoato de estradiol para iniciar uma nova onda folicular e aplicando um luteolítico para evitar a presença de corpo lúteo na data de aspiração. A aplicação de FSH (hormônio folículo estimulante) quatro dias depois (Dia 4) melhora o crescimento da onda folicular em recrutamento, pois ainda não houve a divergência folicular (figura 3). E a aspiração é realizada no dia seguinte (Dia 5).

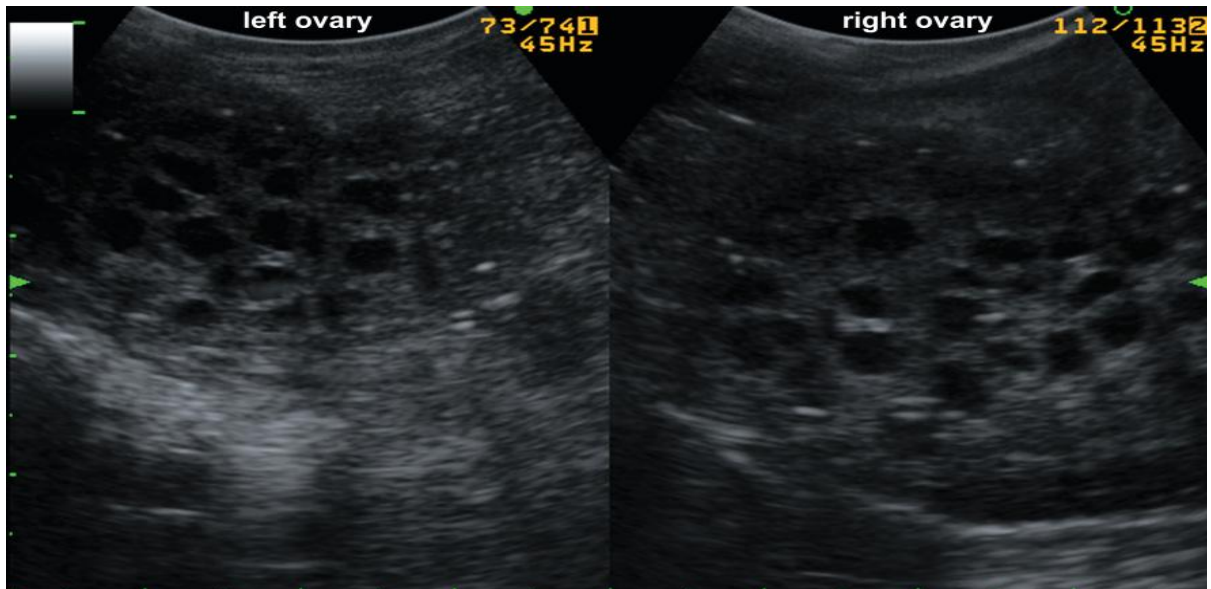


Figura 3: Imagens ultrassonográficas no modo B (probe de 5MHz) é notável a presença de numerosos médios e pequenos folículos no dia 1 da na primeira aplicação de FSH em uma vaca doadora de embriões (DESCÔTEAUX et al, 2010).

2.1.2. Avaliação de fêmeas receptoras de embrião

Para melhores resultados na taxa de prenhez devemos selecionar somente as receptoras com uma boa condição corporal, que não apresentam nenhum tipo de patologia reprodutiva e que estão ciclando regularmente para depois iniciar o protocolo hormonal de sincronização. Com a palpação retal avaliamos a consistência e tamanho do útero, os ovários, e se a morfologia da cérvix permitirá a passagem do inovulador de embriões.

Para a avaliação ginecológica das receptoras, o uso da ultrassonografia é relevante. O ultrassom possui uma melhor acurácia ao avaliar a saúde do útero e ovários quando comparado a palpação retal (DESCÔTEAUX et al, 2010). Com esta técnica podemos selecionar as fêmeas que estão ciclando a partir da presença de um folículo dominante ou do corpo lúteo (Figura 4), visto mais hipoeecogênico quando comparado ao estroma ovariano devido a extensa vascularização (DESCÔTEAUX et al, 2010).

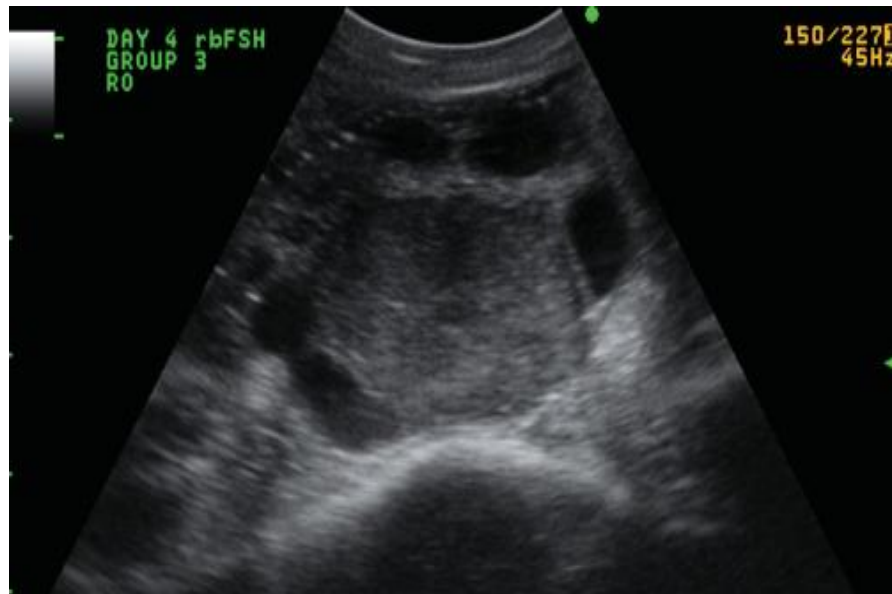


Figura 4: Ultrassonografia de um CL não palpável por estar envolvido por folículos médios. O ovário pode apresentar-se maior quando comparado ao contralateral, mas a ultrassonografia é necessária para fazer um diagnóstico definitivo e fidedigno. A ecogênicidade do corpo lúteo é inconfundível (DESCÔTEAUX et al, 2010).

A figura 5 mostra um exemplo de condição patológica, que poderia impedir uma gestação em uma receptora.

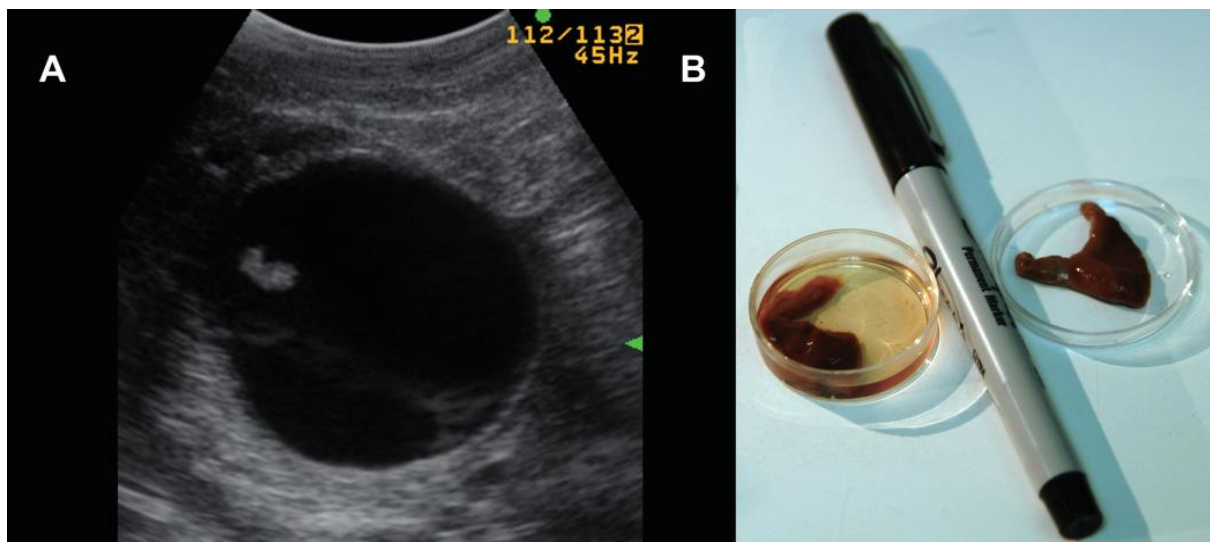


Figura 5: Imagem ultrassonográfica (probe de 5MHz) de uma massa flutuante dentro do conteúdo uterino (anecóico). A: Embora o volume do exsudato seja palpável, a massa visualizada (tecido de miométrio degenerado) não é. E um veterinário iniciante pode confundir esta patologia com uma prenhez inicial. B: Presença do tecido que foi recuperado por uma lavagem uterina terapêutica da receptora, e a histopatologia revelou que a massa era tecido do músculo uterino (miométrio) (DESCÔTEAUX et al, 2010).

As vantagens da incorporação do ultrassom na rotina de avaliação de útero e

ovários no período do pós parto são discutidas porque este método propicia uma melhor acurácia e objetividade ao avaliar o trato reprodutivo no pós parto quando comparada a palpação retal (DESCÔTEAUX et al, 2010).

O exame ultrassonográfico do útero puerperal permite o estudo de sua taxa de involução, se está seguindo de acordo ou se há presença de alguma condição patológica (DESCÔTEAUX et al, 2010), desta forma mais rápida será a seleção das vacas que já estão aptas a receber embriões.

Pesquisas de Sánchez et al, (1999) mostraram que a involução dos cornos uterinos teve duração média de $29,7 \pm 9,6$ dias, com amplitude de variação de 14 a 67 dias e coeficiente de variação de 31,3%.

A figura 6 mostra o útero durante a involução, e a aparência das imagens obtidas com uma probe linear de 7,5 MHz (A) e 5 MHz (B). Nos primeiros dias depois do parto, podem serem visualizados as carúnculas (hiperecogênicas), o líquido no lúmen uterino (anecóico) e a os cornos apresentam-se intumescidos e com a aparência ecogênica desuniforme.

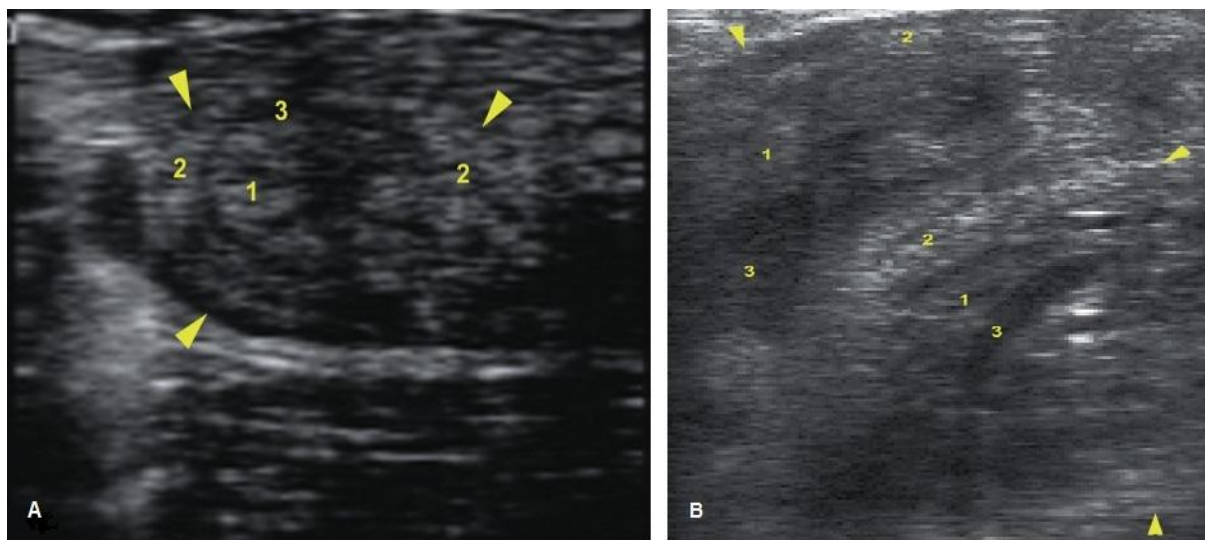


Figura 6: A.: Ultrassonografia dos cornos uterinos em uma visualização transversal entre o 20º e o 25º dia pós parto (probe de 7,5 MHz, profundidade de 5 cm). É notável que a aparência deste útero assemelha-se ao de uma vaca no periestro. O diâmetro do corno uterino é de 3 cm e a involução macroscópica parece estar completa.. 1: Endométrio; 2: Miométrio; 3 Porção vascular do útero; Setas: contorno uterino. B: Vista longitudinal de uma involução uterina normal 15 dias pós parto (probe de 5 MHz, 10 cm de profundidade). É notável a espessura do corno uterino, a presença de líquido no lúmen uterino. O diâmetro uterino é de 5 cm no nível da curvatura maior, em que 1: Endométrio, 2: Miométrio (mais ecogênico) 3: quantidade normal de líquido intraluminal, setas: contorno do útero. (DESCÔTEAUX et al, 2010)

2.2. A aspiração folicular (*Ovum pick up*)

Segundo Bueno e Beltran (2008), uma das vantagens da aspiração folicular guiada por ultrassonografia na PIVE está no fato de que não é necessário o uso de hormônios para a recuperação dos oócitos.

Para evitar alguma contaminação é necessária a higienização da vulva da doadora com água e sabão neutro e secar com papel toalha. Para evitar traumas ao animal e movimentos peristálticos durante a manipulação, é feita uma anestesia epidural utilizando Lidocaína 2% (aproximadamente 5 ml), aplicando-a na articulação sacro caudal (LEIVAS, 2006).

O procedimento de aspiração folicular é realizado utilizando agulhas 18G (COOK VOPAL 1855) conectadas a uma linha de aspiração e bomba de vácuo (COOK VMAR500) ajustando uma pressão de vácuo de 72 a 78 mmHg, com vazão de 15ml de meio por minuto (LEIVAS, 2006). Para visualização da imagem, utiliza-se um equipamento de ultrassom com um transdutor micro convexo de 5 ou 7,5 MHz conectado a uma guia de biópsia, que é inserida até o fundo vaginal. Os folículos a serem aspirados são posicionados no percurso da linha de punção indicada no monitor do ultrassom (figura 7).

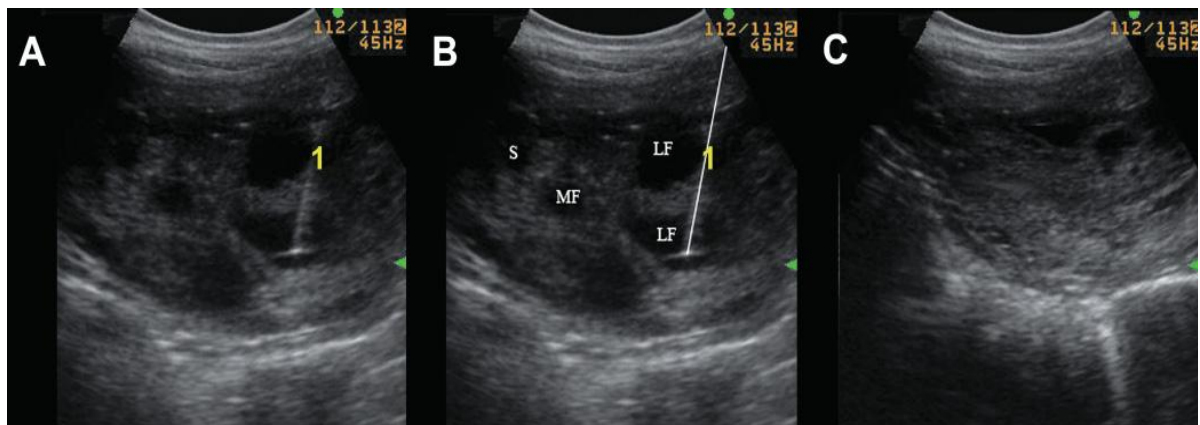


Figura 7 Ultrassonografias de um ovário direito de uma vaca durante e depois de uma aspiração folicular (OPU), realizada com uma probe vaginal curvilínea (microconvexa) de 7,5 MHz equipada com uma agulha. A e B: A agulha (1) passa pelo fórnix vaginal e alcança o ovário, e o veterinário posiciona-a até o folículo e recupera o complexo cumulus oócito (COC). C: imagem ultrassonográfica logo após o procedimento de aspiração. Os folículos já não estão presentes no ovário direito, entretanto, frequentemente os maiores folículos aspirados serão preenchidos por sangue, dando a impressão que não foram retirados. LF: maior (large) folículo; MF: médio folículo; S: pequeno (small) folículo. (DESCÔTEAUX et al, 2010).

O meio de lavagem da agulha e de recebimento dos oócitos deve estar a

aproximadamente 36°C, sendo composto de PBS, heparina e alguns veterinários optam também pelo uso de soro fetal bovino (SFB), que segundo Antonioli (2005) é uma fonte proteica que contém substâncias que interferem na maturação oocitária e no desenvolvimento embrionário tais como: fatores de crescimento, lipídeos, albumina, hormônios esteróides, colesterol e peptídeos. Além disso, o soro fetal bovino impede que oócitos aspirados prendam-se à parede do sistema de aspiração.

2.2.1 Procura dos oócitos:

O material aspirado é transferido para o filtro de colheita de embriões (EmCom®) e lavado com a mesma solução utilizada na aspiração. O sedimento restante no filtro é observado em placas com a utilização de uma lupa.

O oócito, no interior do folículo, está envolto por células da granulosa, formando o complexo cumulus oócito (CCO) (RENESTO e COELHO, 2004). Substâncias reguladoras produzidas pelo oócito têm função importante na atividade das células do cumulus e, da mesma maneira, componentes dessas células somáticas têm participação ativa no mecanismo de crescimento e maturação dos oócitos (GONÇALVES et al, 2007).

São selecionados os oócitos de grau I, II e III. GONÇALVES (2007) descreve: Qualidade 1: Cumulus compacto presente, contendo mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom.

Qualidade 2: Cumulus compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de 3 camadas celulares. Ooplasma, com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche o espaço do interior da zona pelúcida.

Qualidade 3: Cumulus presente, mas expandido. Ooplasma contraído, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino, degenerado, vacuolizado ou fragmentado.

O ideal é que a sala de procura seja um ambiente limpo, e antes de montar os equipamentos o técnico deve colocar um pano de campo esterilizado em sua mesa e utilizar materiais estéreis.

O transporte de oócitos é feito em meio de maturação que pode ser composto por meio TCM 199 Bicarbonato, suplementado com SFB, hCG, FSH, estradiol, piruvato e amicacina a 36°C, utilizando um transportador adaptado. O tempo médio de transporte varia de acordo com a distância da fazenda até o laboratório, o ideal é não deixar passar de 8 horas após o início da aspiração folicular (RENESTO e COELHO, 2004).

2.3. A maturação *in vitro*

A maturação do oócito, envolvendo transformações nuclear e citoplasmática, está ligada a uma série de mudanças estruturais e bioquímicas que tornam o gameta feminino apto a ser fecundado e ter desenvolvimento embrionário subsequente (RENESTO e COELHO, 2004). *In vivo*, esse processo tem início, coincidentemente, com o pico pré ovulatório de LH durante o estro e, *in vitro*, com a simples retirada do oócito do folículo. A maturação nuclear do oócito bovino requer de 18 a 22 horas (GONÇALVES et al, 2007; MONTAGNER et al, 2000) e reiniciam espontaneamente a divisão meiótica (do do estágio de diplóteno da primeira prófase meiótica até a fase de metáfase II (BERTAGNOLINI et al, 2004).

Antoniolli (2005) sugere que o meio de maturação tenha características similares à composição do fluido folicular

O meio de maturação pode ser constituído de meio B199 (Bicarbonato, suplementado com SFB, FSH, LH, estradiol, piruvato e amicacina). Com este meio são montadas em placas de 30cm, micro gotas cobertas por óleo mineral, e são incubadas por 2 horas na estufa a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade para estabilização do meio. Chegando no laboratório os oócitos são transferidos nas micro gotas e maturados por 24 horas (a partir do horário da aspiração).

2.4.. Fertilização *in vitro*

Esta etapa depende da qualidade dos oócitos e da qualidade dos espermatozóides utilizados (CARVALHO NETO, 2009). Após a maturação dos oócitos (figura 8), os espermatozóides viáveis são separados pelo método Swim up ou pelo método gradiente de densidade de Percoll. Deve ser proporcionado um

ambiente adequado para que ocorra a capacitação espermática e a fecundação.

Esse ambiente deve permitir o metabolismo dos oócitos e células do cumulus e manter a função espermática eficiente e para essa finalidade, o meio mais utilizado é o FERT-TALP (ou TALP-FIV) contendo heparina para capacitação espermática (RENESTO e COELHO, 2004).



Figura 8: Foto Digitalizada de oócitos bovinos após 24h de Maturação *in vitro* (PERINI, 2007).

O meio de fertilização pode ser composto de BSA livre de ácidos graxos, meio FIV (exclusivo), piruvato, PHE (penicilamina, hipotaurina, epinefrina), Heparina e Amicacina.

Após serem lavados em 2 gotas de 100 μ L de meio de fertilização, são adicionados de 20 a 22 oócitos por micro gota de FIV e incuba-se a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO₂ (PERINI, 2007) em umidade saturada (GONÇALVES et al, 2007).

Um método muito utilizado para obtenção dos espermatozoides viáveis é pela centrifugação utilizando o meio Percoll (Bicarbonato de sódio, Cloreto de cálcio, Cloreto de Magnésio e Lactato). Em um tubo, o Percoll é preparado na concentração 90%, em seguida a 45% (proporção 1:1) e por último o a dose do sêmen selecionado. Este tubo é submetido a duas centrifugações de 10000 rpm por 20 minutos, para sêmen convencional e a uma centrifugação de 5000 rpm por 5 minutos, para sêmen sexado. O “pelet” obtido é ajustado na concentração de 1×10^6 a

1×10^7 espermatozoides/ml de meio FIV junto aos oócitos. Segundo Gonçalves et al (2007), a concentração final mais utilizada para fecundação *in vitro* é de 2×10^6 espermatozoides/ ml.

2.4.1. A escolha do sêmen

A escolha do sêmen para o acasalamento fica a critério do produtor, que deve analisar as características a serem passadas para os descendentes.

A utilização do sêmen sexado na produção *in vitro* de embriões permite reduzir o tempo para atingir certos objetivos, por exemplo, o de melhorar a qualidade do rebanho e o número de animais que o integram (OSES et al, 2009), produzindo uma proporção ideal de machos e fêmeas. É esperada a elevação do ganho genético em até 15% comparado ao sêmen convencional (TANNO, 2009).

Uma tecnologia empregada no Brasil desde 2008 é a utilização do sêmen reverso na PIVE, capaz de utilizar touros que já não produzem mais sêmen ou que já morreram. O processo é similar ao do sêmen sexado. Descongelam-se duas ou mais doses de sêmen convencional. Uma vez preparada, a amostra é colocada no citômetro de fluxo, onde ocorre a separação dos espermatozoides. Em seguida o sêmen é recolhido em tubos que, posteriormente, são refrigerados a 18° C, para finalmente ser utilizado para fecundação com a determinação de nascimento de fêmeas ou machos. No momento da fertilização o sêmen reverso passa pelo mesmo protocolo de sêmen sexado.

A produção *in vitro* de embriões proporciona um melhor aproveitamento do sêmen sexado e do sêmen reverso, em que apenas uma dose pode fertilizar aproximadamente 100 oócitos.

2.5. Cultivo *in vitro*

Após o tempo de fecundação, os prováveis zigotos são lavados e transferidos para micro gotas de meio de cultivo que é baseado nos fluidos do útero e do oviduto durante o início da gestação (ANTONIOELLI, 2005), recobertas por óleo mineral, permanecendo nestas por um período de 6 a 7 dias até os zigotos atingirem os estádios de blastocisto inicial (BI), Blastocisto (BL), Blastocisto expandido (BX) e em alguns casos em Blastocisto eclodido (BE).

O meio de cultivo pode ser composto de BSA livre de ácidos graxos, meio CR2, de SFB, Alanina, glicina e Amicacina.

O meio de cultivo é renovado em cada micro gota no quarto dia (*feeding*) e no 6º e 7º dia é observado o desenvolvimento embrionário e envase destas estruturas em palhetas de 0,25 ml.

Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos na PIVe a sua utilização crescente em programas de melhoramento bovino, a proporção de embriões que atingem o estágio de blastocisto é, raramente, superior a 40% (NEVES et al, 2010), comercialmente as taxas de blastocisto variam entre 25 e 35%.

2.6. Transferência de embriões

A inovulação é o procedimento em que é depositado o embrião no corno ipsilateral ao corpo lúteo. Sendo usualmente feita pelo método transcervical em que a palheta é colocada em uma bainha estéril e em seguida no inovulador. Para manter a bainha do inovulador livre de contaminações, deve ser usada a camisinha sanitária. Alguns médicos veterinários utilizam a metodologia cirúrgica no flanco. O importante é que em ambos os casos o embrião seja depositado no corno uterino correspondente ao lado onde havia o corpo lúteo previamente palpado.

Na data da transferência (dia 6 ou dia 7) as receptoras devem estar sincronizadas com os embriões, para melhores resultados deve ser usado nestes animais um protocolo hormonal semelhante ao de IATF:



Figura 9 (Exemplo de protocolo hormonal utilizado pela empresa FertVidro® para receptoras).

2.7. Diagnóstico precoce de gestação

A ultrassonografia é um método de diagnóstico que tem uma excelente acurácia, que permite detectar a gestação quando a fêmea está realmente prenha. A acurácia é superior a 95% tão cedo quanto 26 dias após a fertilização (ou

inseminação) e próximo de 100% depois de 29 dias. O diagnóstico precoce permite que o veterinário proponha um novo programa de sincronização para as fêmeas que não ficaram gestantes, alcançando um maior sucesso nas taxas de produção em menor tempo possível (DESCÔTEAUX et al, 2010)

A acurácia do diagnóstico precoce de gestação varia muito e depende de alguns fatores, tais como: tipo e frequência do transdutor, repetição do exame, idade, raça e número de parições dos animais, dias pós cobertura ou inseminação, exame dos ovários, a experiência e as condições de trabalho do técnico (WOLF e GABALDI, 2002).

Com o transdutor pressionado no assoalho do reto, mantendo contato com a superfície dorsal do trato reprodutivo, o diagnóstico precoce de gestação nos grandes animais é realizado com a observação da vesícula alantoideana no corno uterino, bem como a detecção de um corpo lúteo no ovário (WOLF e GABALDI, 2002).

BARROS e VISINTIN (2001) avaliaram a eficácia do ultrassom no diagnóstico precoce de prenhez e nas avaliações das mortalidades embrionárias e fetais e dos sexos de fetos em dois grupos de vacas zebuínas. Utilizaram o ultrassom em modo B e com um transdutor bifrequencial 5 e 7,5 MHz. Um dos resultados mostrou que os fetos mortos e em degeneração visualizados e acompanhados pela ultrassonografia, os quais permaneceram até 52 dias após o primeiro diagnóstico de morte fetal, não apresentaram nenhuma mudança uterina significativa à palpação retal até a expulsão. Além disso descrevem que ultra-sonografia mostrou-se eficaz no diagnóstico precoce de prenhez aos 25 dias, nas avaliações das perdas embrionárias aos 45 dias e fetais aos 60 dias e no diagnóstico do sexo de fetos a partir dos 60 dias de gestação. Os exames ultrassonográficos não causaram perdas gestacionais nos animais.

Portanto as vantagens do uso da ultrassonografia para diagnóstico de gestação são que a presença do embrião pode ser detectada mais rapidamente e que o trato reprodutivo da fêmea prenhe é menos manipulado quando comparado a palpação retal. Desta forma o risco de induzir a uma morte embrionária é muito reduzido (RIBADU e NAKAO, 1999).

As figuras 10 e 11 mostram ultrassonografias de uma prenhez de 30 dias e 47

dias, respectivamente, utilizando uma probe de 7,5 MHz e 6 cm de profundidade.

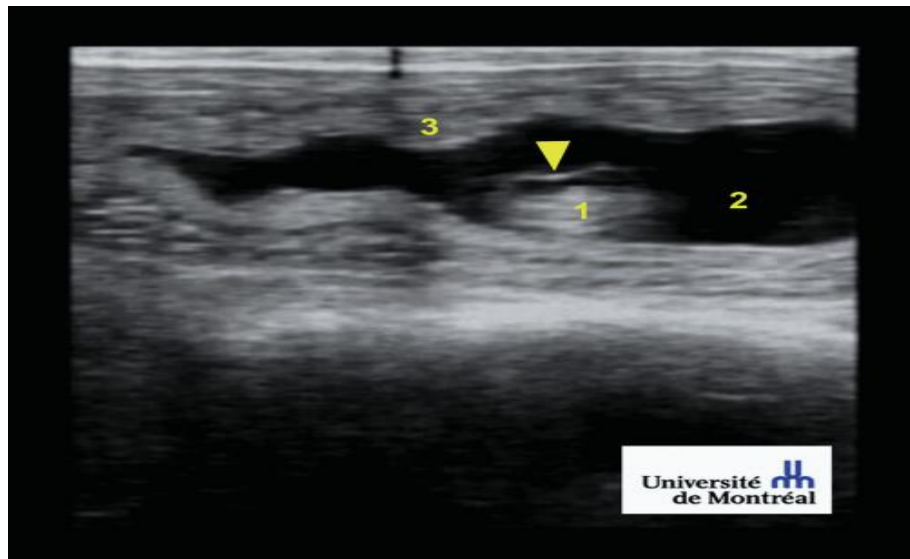


Figura 10. Ultrassonografia de uma prenhez de 32 dias (probe de 7,5 MHz) 1: Embrião de 12mm; 2: Líquido alantoideano; 3: Dobra uterina; Seta: âmnion (DESCÔTEAUX et al, 2010).

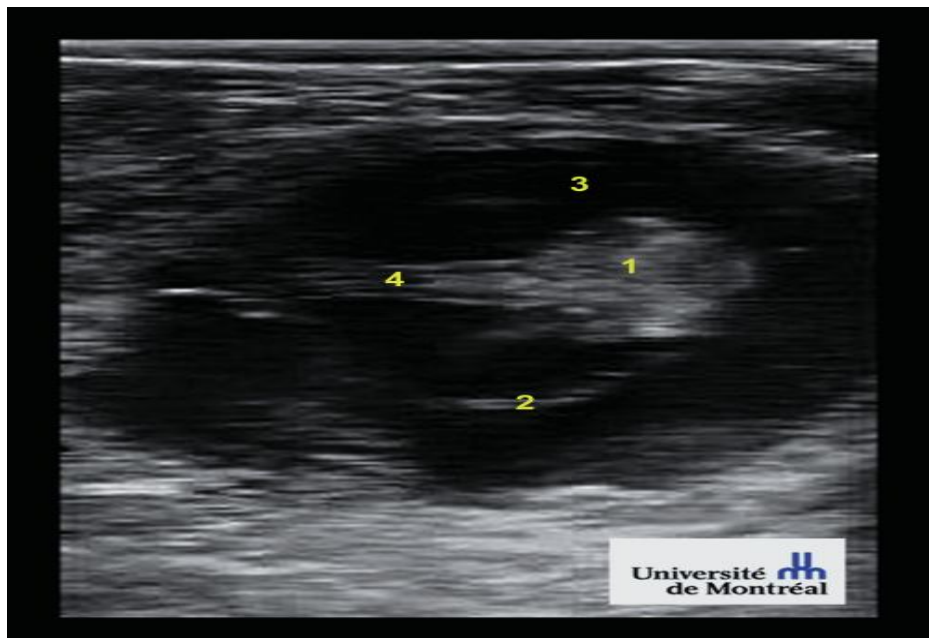


Figura 11: Feto aos 47 dias de gestação utilizando uma probe de 7,5 MHz. (1); Âmnion (2); Líquido alantoideano (3) e o cordão umbilical (4) (DESCÔTEAUX et al, 2010)

2.8. Perdas embrionárias

Considera-se perda embrionária e/ou fetal precoce uma prenhez interrompida involuntariamente durante os primeiros 60 dias (WOLF & GABALDI, 2002).

Nas mortes fetais em gestações mais avançadas o feto não é imediatamente

expelido após ter morrido, onde uma diminuição do fluido placentário é observada, assim como alterações na anatomia estrutural e dos órgãos, e na ecogenicidade do feto (WOLF & GABALDI, 2002).

A morte embrionária é um dos mais importantes fatores associados a infertilidade em vacas. É definida como a perda do embrião entre o momento da fertilização até os primeiros estágios de diferenciação, aproximadamente aos 45 dias de prenhez. A maioria das mortes embrionárias ocorre depois do 25º dia da gestação. Entretanto, o período entre 25 e 45 dias é crítico para a fixação das membranas embrionárias ao epitélio uterino e corresponde ao período onde exames iniciais de gestação são realizados (DESCÔTEAUX et al, 2006).

Quando o veterinário observa que não há presença de batimentos cardíacos do feto, debris ecogênicos nos líquidos amniótico e alantoideano ou uma má definição das estruturas fetais, pode suspeitar de mortalidade (Figura 2) e o exame ultrassonográfico deve ser realizado minuciosamente.

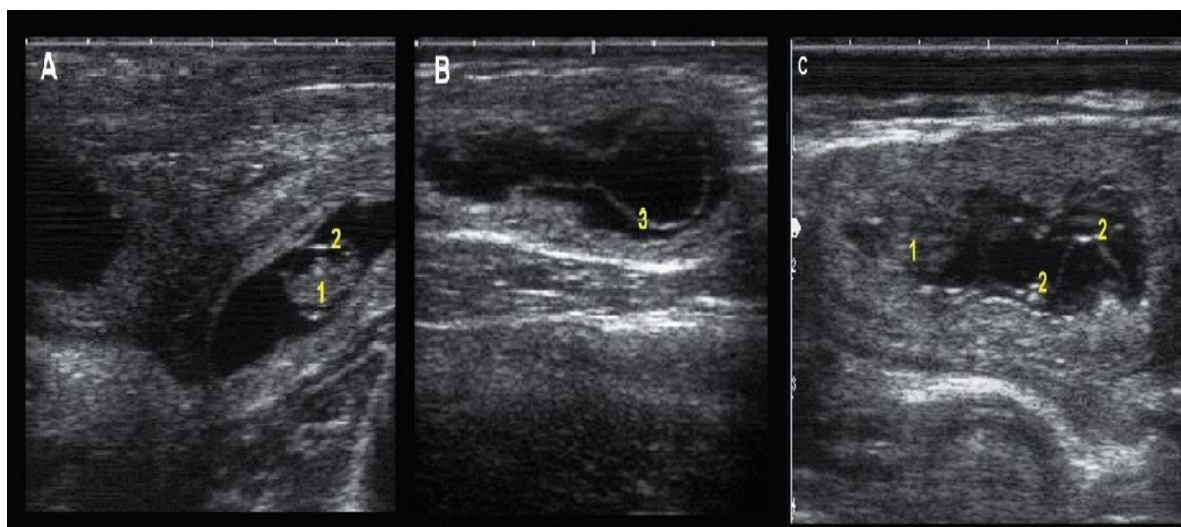


Figura 12 (A e B): Imagens ultrassonográficas de morte embrionárias fetais aos 32 dias de gestação, observando a pouca definição dos contornos uterinos e a hiperecogenicidade membranas amnióticas e corioalantoideanas, utilizando uma probe de 8 MHz e 5 cm de profundidade. 1: Embrião; 2: Âmnion; 3: Líquido Alantoideano. (C): Mesma gestação mas 13 dias após o diagnóstico da perda embrionária (com probe de 10 MHz e profundidade de 4 cm), observando que o líquido alantoideano está turvo, os debris do conceito foram expelidos completamente 5 dias depois. 1: debris embrionários; 2: Membrana corioalantoideana irregular (DESCÔTEAUX et al, 2010).

É preciso ter um conhecimento dos sinais de viabilidade do embrião ou do feto, obtendo um diagnóstico preciso. A maioria das variações durante a perda fetal é muito sutil para ser detectada por palpação retal atrasando alguma intervenção veterinária (DESCÔTEAUX, 2010), como a aplicação de prostaglandina por

exemplo.

2.9. A sexagem fetal

A sexagem fetal, pela ultra-sonografia, surge como uma nova perspectiva para o planejamento do rebanho, agregando valor ao produto final pois permite maior concentração de machos nos rebanhos produtores de carne ou de fêmeas nos de leite (WOLF e GABALDI, 2002).

O uso da ultrassonografia para a sexagem fetal é muito útil para os criadores de animais de elite, pois usam essa ferramenta para saber, tão cedo quanto em 60 dias de gestação, o sexo do bezerro resultante de uma transferência de embrião de uma vaca de alto valor genético, não precisando esperar até o nascimento para confirmá-lo. Assim esses criadores podem incluir esta abordagem nas decisões do manejo dos animais (DESCÔTEAUX et al, 2010), por exemplo: em muitas propriedades ao fazer a sexagem fetal, a receptora já recebe a identificação com o sexo e a previsão de parto. Desta forma, o produtor agrega valor ao produto final pois permite maior concentração de machos nos rebanhos produtores de carne ou de fêmeas nos de leite ou de doadoras de embrião.

Segundo Descôteaux et al (2006), o diagnóstico ultrassonográfico do sexo fetal envolve três passos: localização e identificação do feto no útero gravídico, verificação da viabilidade do feto e determinação do sexo fetal. O intervalo ideal para esta avaliação (pelo posicionamento do tubérculo genital) é entre o 60º e o 70º dia de gestação (DESCÔTEAUX et al, 2010).

O tubérculo genital tanto no macho como na fêmea é visualizado na tela como uma estrutura bilobulada e com ecogenicidade semelhante a do osso, e sua aparência é igual no macho e na fêmea. Entretanto o que determina o diagnóstico é a posição do tubérculo genital (DESCÔTEAUX et al, 2010).

2.9.1. Características do macho

Por volta do 50º ao 58º dia de gestação, o tubérculo genital masculino alcança sua posição final, caudalmente ao umbigo (DESCÔTEAUX et al, 2010). Ao localizar o feto, a probe é lentamente movimentada de forma a escanear o cordão umbilical até o local de sua inserção no abdome do feto, onde será formada a imagem do

tubérculo genital (hiperecogênico).

Entre o 65º e 70º dia da gestação, a aparência do tubérculo genital apresentará uma mudança: antes eram observadas duas estruturas lobuladas, passando a mostrar quatro estruturas lobuladas representando as dobras urogenitais e durante este estágio a bolsa escrotal está unida a linha mediana (DESCÔTEAUX et al, 2010), assim como apresenta a figura 13.

A descida dos testículos no feto bovino é por volta do 90º ao 130º dia da gestação. Devido a estas observações após o 70º dia, a avaliação do tubérculo genital deve ser interrompida (DESCÔTEAUX et al, 2010)

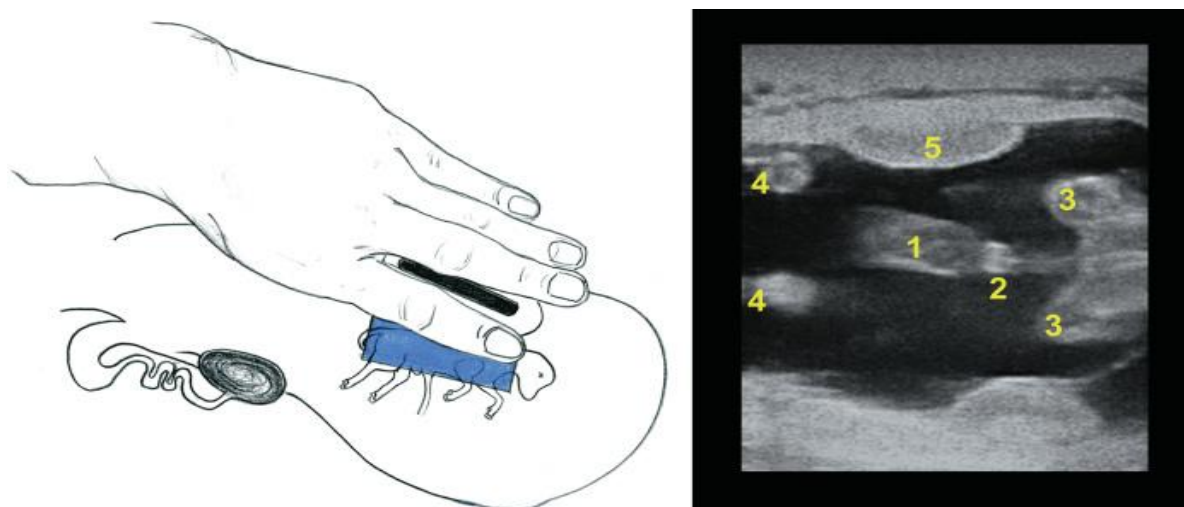


Figura 13: Feto bovino do sexo masculino de 65 dias. A figura à esquerda mostra o posicionamento da probe e do feto. E à direita mostra a imagem ultrassonográfica no momento da avaliação (probe de 7,5 MHz). Em que (1) Cordão umbilical; (2) Tubérculo genital masculino; (3) membros pélvicos (4) membros torácicos (5) Placentoma; (DESCÔTEAUX et al, 2010).

2.9.2. Características da fêmea

Na fêmea o tubérculo genital alcança sua posição final, cranialmente a cauda (vista ventral), por volta do 58º dia de gestação. O tubérculo dará origem ao clitóris e a dobra urogenital formará os lábios vulvares (DESCÔTEAUX et al, 2010), assim como mostram as figuras 14 e 15.

O técnico deve também observar o cordão umbilical até sua inserção no abdome e se forma alguma imagem hiperecogênica neste local, pois a bolsa escrotal pode ser confundida com o tubérculo genital feminino no caso de um feto do sexo

masculino visualizado em uma gestação com mais de 70 dias, assim como mostrado na figura 16.

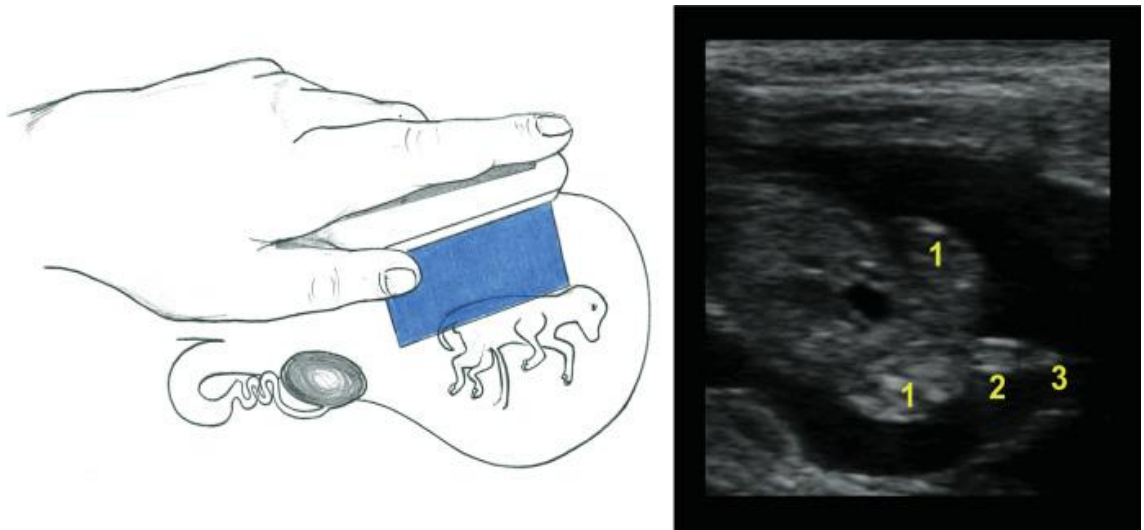


Figura 14: Feto bovino do sexo feminino, aos 60 dias de gestação em um plano longitudinal. À esquerda figura mostra o posicionamento da probe e do feto e à direita a figura mostra a imagem ultrassonográfica visualizada (probe de 7,5MHz). (1): Membros pélvicos; (2): Tubérculo genital (3) Cauda (DESCÔTEAUX et al, 2010)

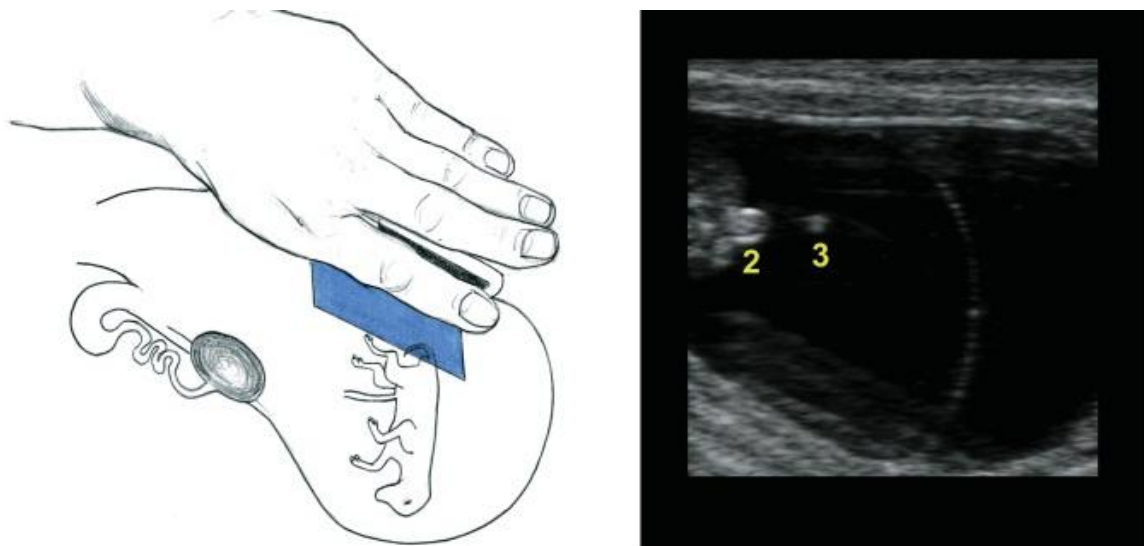


Figura 15: Fêmea aos 60 dias de gestação, à esquerda: o posicionamento da probe e do feto dentro do útero. À direita: imagem ultrassonográfica (probe de 7,5MHz) capturada neste momento. (2): Tubérculo genital; (3): Vértebra caudal (DESCÔTEAUX et al, 2010)

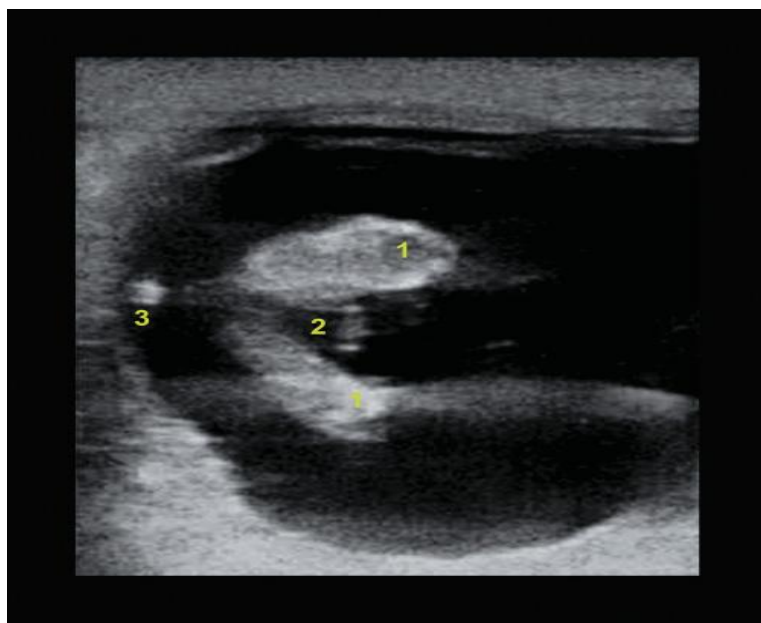


Figura 16: Imagem ultrassonográfica (probe de 7,5MHz) de um feto do sexo masculino aos 72 dias da gestação. Esta imagem representa uma situação em que um profissional com pouca experiência pode realizar uma identificação incorreta das estruturas. (1): membros posteriores; (2) Bolsa escrotal; (3) Vértebra caudal (que pode ser confundida com a genitália externa da fêmea). (DESCÔTEAUX et al, 2010).

A diferenciação do trato feminino é concluída por volta do 70º dia da gestação, e as glândulas mamárias são de 0,6 a 3 mm de diâmetro no 80º ao 130º dia, a partir desta data a avaliação pelo tubérculo genital deve ser interrompida (DESCÔTEAUX et al, 2006).

3. O controle da qualidade dos laboratórios de FIV

O laboratório deve fornecer um ambiente asséptico para a manipulação dos oócitos e embriões, a temperatura deve ser devidamente controlada, em torno de 25°C (GONÇALVES et al., 2007), e a iluminação deve ser adequada para a manipulação de gametas e embriões (penumbra ou luz amarela não fluorescente) (ELDER e DALE, 2000).

Para manutenção da qualidade dos procedimentos deve-se utilizar materiais descartáveis, estéreis e devidamente testados para laboratório de FIV (GALUPPO, 2004).

Os meios de cultura produzidos comercialmente devem ser monitorados quanto à forma de transporte, armazenamento e integridade dos frascos (GALUPPO, 2004).

Os profissionais devem saber que este é um ambiente asséptico e por isso devem utilizar uma paramentação adequada, evitar o uso de perfumes ou acessórios desnecessários para o local (brincos, colares, anéis.)

Cada um dos procedimentos realizados em um laboratório de FIV deve ser executado com extrema atenção e responsabilidade. Descuidos ou falta de atenção podem provocar danos ao desenvolvimento do embrião *in vitro* e consequentemente prejudicar os resultados obtidos pelo laboratório (GALUPPO, 2004).

Todo laboratório deve realizar testes frequentemente, para avaliação da sua eficiência na produção de embriões, utilizando ovários provenientes de abatedouros.

Portanto a falta de comprometimento com as normas pré-estabelecidas põe em risco a segurança não só do indivíduo responsável, mas também, de toda a equipe e dos animais, podendo resultar em danos para os gametas e embriões e até na transmissão de doenças.

4. Conclusão

A PIV é uma técnica que permite um maior aproveitamento da fêmea e do sêmen, permitindo a utilização dos reprodutores com alto valor comercial, além do uso do sêmen sexado.

A utilização do sêmen sexado na produção *in vitro* de embriões permite reduzir o tempo para atingir certos objetivos, como o de melhorar a qualidade do rebanho e o número de animais que o integram, além disso, há maior aproveitamento do sêmen pois com apenas uma dose podemos fertilizar oócitos de mais de uma fêmea, o que não ocorre na superovulação e TE convencional.

Exames ultrassonográficos do trato reprodutivo podem ser de grande importância para determinar se um animal está apto para reprodução, qual a fase do ciclo estral ou se apresenta alguma desordem do trato reprodutivo. A técnica da ultrassonografia também é eficaz no diagnóstico precoce de prenhez aos 25 dias, assim como nas avaliações das perdas embrionárias entre 25 e 45 dias e fetais entre 45 e 60 dias de gestação, revelando que o diagnóstico precoce da prenhez é importante para determinar o período da gestação em que ocorrem as maiores perdas gestacional. A sexagem dos fetos é segura a partir dos 60 dias de gestação, agregando valor ao produto final.

O controle da qualidade do laboratório é essencial para melhores resultados na produção de embriões bovinos.

5. Referências Bibliográficas

ANTONIOELLI, C. B. **Produção in Vitro de embriões bovinos utilizando diferentes condições de maturação oocitária**. Tese (Mestrado). Arquivo da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005. Disponível em : <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/4329/000500091.pdf?sequence=1>> Acessado em 21 junho 2011.

BARROS, J. P.; VISINTIN, J. A. Controle ultrassonográfico de gestações, de mortalidades embrionárias e fetais e do sexo de bovinos zebuínos. **Brazilian Journal of Veterinary research and Animal Science**. V 38. n 2. São Paulo, 2001.

BELTRAME, R. T., et al. Análise da Produção de embriões na Fertilização *in Vitro* e transferência de embriões para doadoras Nelore. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 1, p. 17-23, jan./mar. 2010.

BERTAGNOLLINI, A. C., et al. Interação entre células do cumulus e atividade da proteína quinase C em diferentes fases da maturação nuclear de oócitos bovinos. **Arquivo brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, Santa Maria, RS, 2004. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352004000400010> Acessado em 21 junho 2011

BUENO, A. P., et al. Cistos ovarianos em fêmeas da raça bovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. [S.l.] ano IV, n. 08. São Paulo, 2007.

BUENO, A. P.; BELTRAN, M. P. Produção in Vitro de embriões Bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. [S.l.] ano IV, n. 11. São Paulo, 2008. Disponível em <<http://www.revista.inf.br/veterinaria11/revisão/edic-vi-n11-RL83.pdf>> Acessado em 24 junho 2011

CARVALHO NETO, J. O. **Avaliação da qualidade do espermatozóide bovino criopreservado após sexagem por citometria de fluxo e sua utilização na Produção in vitro de embriões**. Tese (Mestrado). Arquivo da Faculdade de Medicina e Veterinária da Universidade de Brasília, 2009.

DESCÔTEAUX, L.; GNEMMI, G.; COLLOTON, G. Principles and recommendations in ultrasound imaging. In: **Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography**. p. 23-25, 1ª ed. Editora Willey Blackwell, USA, 2010

DESCÔTEAUX, L.; CARRIÈRE, P. D.; DUROCHER, J. Ultrasonography of the Reproductive System of the Cow: Basic principles, Practical uses and Economic aspects of this diagnostic tool in Dairy Production. In: 24th World Buiatrics Congress, october, 2006, Nice, France. **Anais...** [s.n.].

ELDER, K.; DALE, B. The Clinical in vitro Fertilization laboratory. In: **In vitro**

Fertilization, 2ª ed. EditoraCambrige University Press. p.109-116, 2000. Disponível em: <<http://vijay.sitesled.com/journal/In%20vitro%20fertilisation.pdf> > Acessado em 24 junho 2011.

GONÇALVES, P. B. D., et al. **Produção *in vitro* de Embriões**. In:GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas á reprodução animal. 2 ed., São Paulo, Editora Roca LTDA., 2007. p. 195-224.

GRIFFIN, P. G.; GINGTHER. O. J. **Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology**. Journal of Animal Science. p. 954, 2002. disponível em: <jas.fass.org/content/70/3/953> acessado em 10 junho 2011

HERRING, D.S. e BJORNTON, G., Physics, Facts, and artifacts of Diagnostic Ultrasound. Seminars. **Veterinary Medicine and Surgery (Small animal)** 4 (1): 2-12, 1989.

KURTZ FILHO, M., et al. Maturação e fecundação in vitro de oócitos bovinos em tubos previamente gaseificados e mantidos em banho-maria. **Archives of Veterinay Science**, v. 7, n. 2. p 121-127. Santa Maria, RS, 2002. Disponível em : <<http://www.ufsm.br/embryolab/KURTZ%20FILHO%202002%20ArchVSc.pdf> > Acessado em: 20 junho 2011

LEIVAS, F. G. **Influência da Atmosfera Gasosa e da Fonte Proteica sobre o desenvolvimento embrionário in vitro e taxa de prenhez em Bovinos**. Tese (Doutorado). Pp 40-42. Arquivo Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, 2006

MERTON, J. S., et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding indurstry. **Theriogenology**. V. 59, p. 651-674. 2003.

MONTAGNER, M. M., et al. Hepes na Produção de Embriões in Vitro. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v.30, n .3, p. 469-474, 2000. Disponível em <<http://repositorio.bce.unb.br/handle/10482/7077> > Acessado em: 22 junho 2011

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da Reprodução dos Animais domésticos**. 2 ed. pp. 17-53, 2003.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; Tortorella, R. D. **Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI**. Revista Brasileira de Zootecnia. v.39. p. 418. Brasília – DF, 2010.

OSSES, M. V.; TERUAL, M. T.; CABODEVILA, J. A. **Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización *in Vitro***. Tese (Monografia de conclusão de curso). Arquivo da Facultad de Ciencias Veterinarias (UNCPBA). Argentina, 2009. Disponível em <http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/166-Utilizacion_Oses.pdf > acessado em 23 junho 2011

PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, a. r. Diagnóstico de gestação e sexagem fetal em caprinos por ultrassonografia. **Acta Veterinaria Brasilica**. v.4. P S30-S35. Mossoró-RN, 2010.

PERINI, A. P. **Separação dos espermatozóides “X” viáveis, de sêmen congelado, por gradiente descontínuo de densidade, na Produção in Vitro de embriões destinados a criopreservação**. Tese (Mestrado). Arquivo da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP. São Paulo, 2007

RENESTO, A.; COELHO, L. A. **Associação das biotécnicas: Aspiração folicular guiada por ultrassonografia e superovulação na produção in vitro e in vivo de embriões bovinos**. Tese (Mestrado). Arquivos da Faculdade de Ciências Agrárias UNESP. p.17-31., 2004.

RIBADU, A. Y.; NAKAO, T.; Bovine Reproductive Ultrasonography: a Review. **Journal of Reproduction and Development**, Vol. 45, No. 1, Department of Veterinary Obstetrics and Gynecology, Rakuno Gakuen Universit. Japan, 1999.

SÁNCHEZ, G. J. P., SOBRINHO, E.B. GONÇALVES, A. A. M. Involução uterina em um rebanho Gir leiteiro segundo o período pós-parto e o número de parições. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 4, Belo Horizonte , 1999. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09351999000400010&script=sci_arttext > Acessado em: 22 junho 2011

SARTORI, R., et al. Fatores que influenciam a qualidade embrionária em Bovinos. In: 4º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, setembro 2010, Londrina, PR. **Anais...** [s.n.]

TANNO, P. H. **Estudo das alterações morfo funcionais de espermatozóides bovinos submetidos à sexagem por meio da técnica de citometria de fluxo**. Tese (Mestrado). Arquivo da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2009.

WOLF, A.; GABALDI, S. H. Acompanhamento ultrassonográfico da gestação em grande animais II. **Ciências Agrárias e Saúde**. v 2. n 2. FEA, Andradina. pp 79-82, 2002.