

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNA JATAÍ
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS: Revisão de literatura

José Pedro Ferreira Machado

Lázaro Kalliu Assis Oliveira

Wesley Paulo Alves de Lima

Jataí - GO

2023

RESUMO

A Transferência de Embrião (TE) em bovinos se trata de uma técnica mundialmente disseminada com objetivo de aumentar a capacidade reprodutiva da fêmea. Mantém vínculo direto com outras técnicas das biotecnologias da reprodução, como, a Ovum Pick-Up (OPU), Produção In Vitro e In Vivo de embriões (PIVE) e Transferência de Embrião em Tempo Fixo (TETF), sendo estas, técnicas que fazem parte de um processo, que vai desde a seleção de doadoras, passando pelo preparo dos embriões até sua inovulação em receptoras criteriosamente selecionadas. Com seu avanço, várias tecnologias de manejo vêm sendo implantadas: formas no transporte de embriões, protocolos de sincronização de doadoras e receptoras, e protocolos de recuperação de oócitos para produção de embriões. Isto infundiu a tecnologia, porém, os investimentos previstos para a produção de um animal de alto mérito genético limita sua utilização. Contudo, esta análise abordou avanços tecnológicos essenciais para o sucesso da TE, incluindo novos protocolos, sexagem de embriões, além do uso de embriões congelados Direct Transfer (DT) e vitrificados. No entanto, é claro que o sucesso do procedimento está no processo como um todo, em destaque ressalta-se que é de grande valia que o profissional apto a executar a técnica esteja sempre preparado e atualizado garantindo qualidade, eficiência e sustentabilidade na pecuária. Esta revisão foi desenvolvida com o propósito de adquirir conhecimento teórico, de forma detalhada e crítica, nas técnicas e procedimentos de Transferência de Embriões em bovinos, incluindo a colheita, manipulação e implantação de embriões.

Palavras-chaves: Bovino, doadora, embrião, receptora.

ABSTRACT

Embryo Transfer (ET) in cattle is a globally widespread technique aimed at enhancing the reproductive capacity of females. It is closely linked to other techniques in reproductive biotechnologies, such as Ovum Pick-Up (OPU), In Vitro and In Vivo Embryo Production (PIVE), and Timed Embryo Transfer (TET), all of which are part of a process that ranges from donor selection, through embryo preparation, to their inoculation into carefully chosen recipients. With its advancement, various management technologies have been implemented: including methods for embryo transport, synchronization protocols for donors and recipients, and oocyte recovery protocols for embryo production. Although technology has been infused, the anticipated investments for producing animals of high genetic merit limit its widespread use. However, this analysis addressed essential technological advances for the success of ET, including new protocols, embryo sexing, as well as the use of frozen-thawed (DT) and vitrified embryos. Nevertheless, it is clear that the success of the procedure lies in the entire process. Notably, it emphasizes the significant value of having a qualified professional who is always prepared and updated to ensure quality, efficiency, and sustainability in livestock farming. This literary review was developed with the purpose of acquiring theoretical knowledge, in a detailed and critical way, on the techniques and procedures of Embryo Transfer in cattle, including the collection, manipulation and implantation of embryos.

Keywords: Bovine, donor, embryo, recipient.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolo de SOV combinando observação do cio natural com o uso de FSH e PGF2 α	17
Tabela 2 - Protocolo de SOV com a combinação de FSH, E2, P4, CIDR e PGF2 α	17
Tabela 3 - Protocolo de SOV baseado no cio natural, com associação de FSH, PGF2 α e GnRH/LH para a ovulação em tempo fixo.....	18

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - anatomia do trato reprodutivo da fêmea bovina.....	7
Figura 2 - Representação do ciclo estral em bovinos, mostrando as fases do proestro, estro, metaestro e diestro, com níveis hormonais correspondentes.....	9
Figura 3 - Esquema fechado para colheita e embriões	20
Figura 4 - Desenho esquemático da lavagem uterina; demonstrando o posicionamento da sonda de <i>foley</i>	20
Figura 5 - Avaliação das variações morfológicas do embrião de acordo com seu estágio de desenvolvimento.....	23
Figura 6 - Classificação morfológica dos embriões.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BVD	Diarreia viral bovina
CIDR	Controlled Internal Drug Release Device
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IBR	Rinotraqueíte infecciosa bovina
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
LH	Hormônio Luteinizante
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
OPU	Ovum pick-up (Aspiração folicular)
PBS	Phosphate Buffer Saline (Solução Salina Tampão Fosfato)
DPBS	Dulbecco Phosphate Buffered Saline
PGF2 α	Prostaglandina dois alfa
PIVe	Produção <i>in vitro</i> de embriões
TE	Transferência de Embrião
TIFOI	Transferência intrafolicular de oócitos imaturos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivos Gerais.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 MATERIAI E MÉTODOS.....	4
4 DESENVOLVIMENTO.....	5
4.1 Transferência de Embriões em Bovinos.....	5
4.1.1 História e evolução da técnica.....	5
4.1.2 Anatomia do trato reprodutivo de fêmeas bovinas.....	6
4.1.3 Ciclo estral bovino.....	7
4.1.4 Nutrição.....	9
4.1.5 Novas tecnologias.....	10
4.2 Técnicas e procedimentos na Transferência de Embriões em Bovinos.....	12
4.2.1 Seleção de doadoras.....	13
4.2.2 Aspiração intrafolicular de oócitos.....	13
4.2.3 Produção "in vitro" de embriões bovinos para Transferência de Embriões.....	14
4.2.4 Protocolos de superovulação usados em doadoras.....	15
4.2.5 Técnica de recuperação de embriões via transcervical.....	18
4.2.6 Seleção de embriões.....	21
4.2.7 Técnica implantação de embriões nas receptoras.....	25
5 CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

A Transferência de Embriões (TE) em bovinos é uma técnica amplamente disseminada em escala global (PAZZIM, 2021). Uma das diretrizes primordiais da TE é ampliar a capacidade reprodutiva das fêmeas, abrindo portas para a geração de um número substancialmente maior de descendentes com qualidade genética superior. Este feito é algo que, muitas vezes, se torna inalcançável através de processos fisiológicos naturais ou mesmo com o uso da inseminação artificial ao longo de suas vidas reprodutivas (PASA, 2008). Contudo, esta técnica nos proporciona diversos embriões por ano de uma fêmea doadora sem que ela tenha que passar por um processo de gestação e parto (BRANDÃO, 2019).

No ano de 1891, foi quando Walter Heape fez a primeira e bem sucedida TE em coelhos, desde então a Transferência de Embrião foi relatada em todas as espécies de animais domésticos (HAFEZ, 2004). No entanto, o primeiro bezerro produzido por meio da TE nasceu no início do ano de 1950 por meio de um procedimento cirúrgico (CARVALHO et al., 2023).

A TE continuou a evoluir de forma rápida, principalmente na produção de embriões in vitro. Ao compararmos a evolução ao longo do tempo da técnica de Transferência de Embriões com a Inseminação Artificial, podemos observar que a TE avança em um ritmo aparentemente mais lento. No entanto, é crucial destacar que tanto a TE quanto a IA desempenham papéis igualmente significativos na área da reprodução animal. Atualmente os embriões podem ser colhidos e transferidos sem cirurgia fazendo com que essa biotecnologia se torne mais comum e acessível (CARVALHO et al., 2023; PAZZIM, 2021).

Apesar de todos os avanços tecnológicos a TE não é uma técnica ausente de falhas, ela apresenta pós e contras uma de suas principais vantagens e a rápida multiplicação de uma genética superior, controle do sexo do indivíduo, previne a disseminação de doenças e permite a multiplicação de animais que ainda não atingiram a maturidade sexual, algumas de suas desvantagens é o alto custo operacional, condições mínimas de estrutura para realização do procedimento, bom índice de concepção das doadoras e um rigoroso manejo sanitário tanto das doadoras quanto das receptoras, todos estes fatores influenciam no resultado do procedimento, sendo mão de obra capacitada e a estrutura um dos principais gargalos para que a TE se dissemine com maior facilidade (MARTINEZ E SOUZA 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Realizar uma revisão de literatura com o propósito de adquirir conhecimento teórico, de forma detalhada e crítica, nas técnicas e procedimentos de Transferência de Embriões em bovinos, incluindo produção, colheita, manipulação e implantação de embriões. Além disso, objetiva descrever as evoluções tecnológicas históricas nessa área.

2.2 Objetivos Específicos

1. Descrever as técnicas e procedimentos envolvidos na transferência de embriões em bovinos, incluindo a produção, colheita, manipulação e implantação de embriões.
2. Descrever previamente as evoluções tecnológicas em transferência de embriões em bovinos.
3. Discutir os avanços tecnológicos recentes na área da transferência de embriões em bovinos, destacando inovações em protocolos e equipamentos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A abordagem deste estudo é direcionada para a análise de dados pertinentes à temática, por meio de uma extensa pesquisa bibliográfica que abrange uma variedade de fontes como artigos especializados, publicações periódicas, obras literárias e fontes online como Scielo, Google Acadêmico e biblioteca acadêmica. Além disso, a pesquisa também incorpora a análise de conteúdos publicados por autores renomados na área, bem como a consulta a livros digitais específicos sobre o assunto em questão. Durante o processo de coleta de dados, foi excluído quaisquer artigos, livros ou fontes que não se alinhassem com o escopo específico do estudo.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Transferência de Embriões em Bovinos

4.1.1 História e evolução da técnica

A transferência de embriões teve início em 1891, quando Walter Heape obteve sucesso pela primeira vez em uma transferência de embrião em coelhos. A partir desse marco inicial, a técnica começou a ser documentada em todas as espécies domésticas (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Desde então, inúmeros estudos foram conduzidos e publicados, contribuindo para o desenvolvimento e posterior comercialização dessa tecnologia na América do Norte durante a década de 1970 (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Já no Brasil os primeiros registros de transferência de embriões em animais foi na década de 1980, e em 1990, o país já dominava a técnica e já tinha um mercado consolidado de produção e transferência de embriões (RUBIM, 2005).

A primeira tentativa de transferência de embrião em bovinos realizada no mundo ocorreu na metade do último século por Willet, mas foi em 1950 que obtiveram sucesso onde nasceu o primeiro bezerro oriundo desta técnica (CARVALHO et al, 2023). A partir deste marco histórico, a TE ganhou força e reconhecimento, e a partir dos anos 70 a técnica ganhou espaço na produção comercial de bovinos inicialmente utilizado nos Estados Unidos da América, se difundiu pelo mundo (PAZZIM, 2021).

No Brasil a primeira TE foi realizada em 1977 na Universidade Federal de Santa Maria pelo Prof. Dr. Joachim Hahn. Ele realizou a técnica em cinco animais da raça holandesa vermelha e branca, mas infelizmente nenhuma dessas transferências resultou em gestação. E somente por volta dos anos de 1979-1980 que nasceu o primeiro bezerro de TE no Brasil (RUBIM,2005)

A primeira técnica utilizada na TE foi a técnica de transferência cirúrgica via laparotomia, por meio desta, os animais eram submetidos a sedação e se fazia uma incisão na fossa paralombar do animal dando acesso a cavidade e ao útero, se exterioriza o órgão e depositava o embrião no corno ipsilateral à ovulação (PAZZIM, ,2021). Com o passar dos anos, iniciou-se uma busca por novas formas de TE menos invasivas que a cirúrgica, chegando-se a técnica transvaginal, que é até hoje utilizada por sua praticidade e segurança (SEIDEL,2005)

Essa evolução impressionante na indústria da transferência de embriões não só estabeleceu o Brasil como líder mundial, como também trouxe uma série de impactos

econômicos e tecnológicos. Isso foi possível através do desenvolvimento tecnológico a qual trouxe novas formas de cultivo e de colheita embrionárias. Cita-se a aspiração folicular, a qual possibilitou a utilização de animais não ativos sexualmente, sendo possível colher o material genético deste indivíduo a partir de dois a três meses de idade, significando que quando esse animal atingir a maturidade sexual já terá filhos nascidos. Demonstrando assim o quão vantajosa é essa técnica, pois se faz viável avaliar a capacidade que estes animais têm de transmitir sua genética em um menor espaço de tempo, o que, de forma natural, demoraria cerca de 4 anos para se conseguir obter as primeiras progênes destes animais, otimizando a coleta dos resultados (SENADA, et al. 2002).

Foi justamente esta possibilidade de uma rápida e eficaz proliferação genética que fez com que a TE se difundisse tão facilmente, pois os benefícios alcançados com ela são inúmeros, desde o ganho genético até a otimização de tempo em que se consegue esses resultados (VIANA e GONÇALVES,2019)

4.1.2 Anatomia do trato reprodutivo de fêmeas bovinas

De acordo com Caetano, (2023), o trato reprodutor da fêmea bovina é composto por ovário, útero, cérvix, vagina e vulva. Tendo o ovário ligação direta no sistema endócrino, atuando na regulação e produção de gametas localizados na extremidade de cada oviduto.

Caetano (2023), trás também em sua literatura que o outro órgão envolvido no processo reprodutivo é o útero, sendo ele dividido em três partes, onde: os cornos (2), o corpo e o colo do útero. Tendo este como principal função alocar o embrião e o feto posteriormente.

A figura 1 demonstra a organização e os órgãos que compõem o trato reprodutivo feminino bovino.

4.1.3 Ciclo estral bovino

O ciclo estral das vacas pode ser dividido em duas fases distintas: A fase estrogênica ou folicular, caracterizada pelo recrutamento e crescimento dos folículos (proestro e o estro), e a fase progesterônica ou luteal, em que ocorre a ovulação e a produção de progesterona pelo corpo lúteo (metaestro e diestro). As fêmeas bovinas são consideradas poliéstricas não estacionais, apresentando múltiplos ciclos ao longo do ano, com duração média de 21 dias (VALLE, 1991).

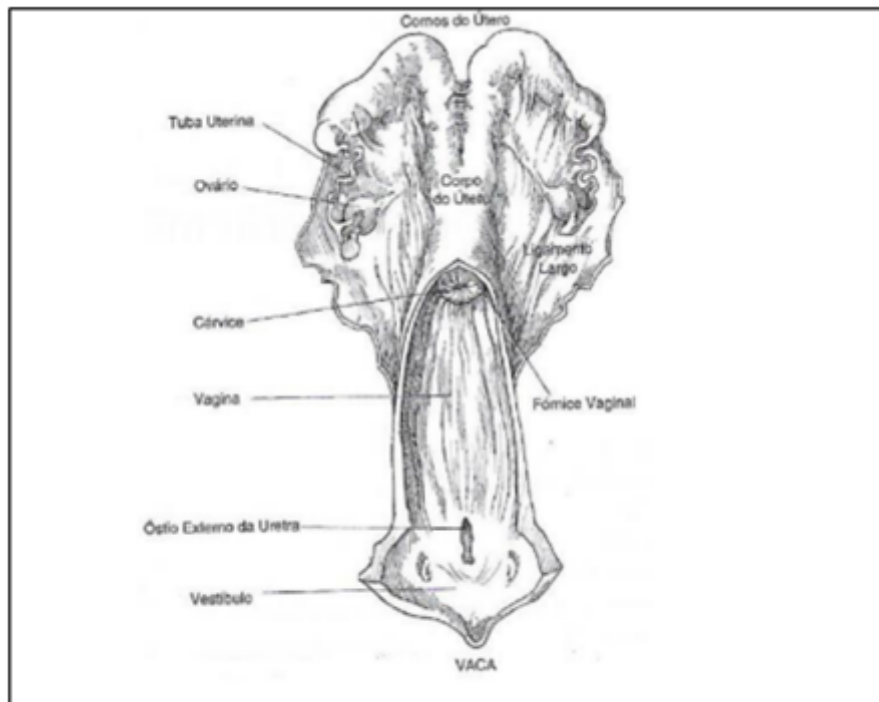


Figura: 1. Figura representativa do trato reprodutivo da fêmea bovina. Fonte: (Fidelis, 2019)

Durante o proestro, como o próprio nome sugere, é uma fase que antecede o estro e tem de 3 a 5 dias de duração. Nesta fase, os níveis de P4 caem e há um aumento nos níveis plasmáticos de estrógeno (E2). É neste período que ocorre o aumento da secreção de Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), estimulando o desenvolvimento e a maturação folicular. O folículo dominante começa a produzir volumes crescentes de estradiol, e quando atinge o pico máximo de produção, são observados os sinais comportamentais do estro manifestados pelas fêmeas bovinas (BRANDÃO, 2019).

Durante o estro, as fêmeas bovinas exibem comportamentos característicos, como agitação, tentativas de monta em outros animais, vocalização intensificada, perseguição de companheiros, redução na produção de leite (em vacas de alta produção). E ainda liberação de muco cristalino pela vulva e diminuição do consumo de alimentos. Esse estágio nos bovinos dura de 8 a 18 horas, durante as quais ocorre um notável aumento na produção de estradiol pelo folículo pré-ovulatório (PAZZIM, 2021).

O metaestro é a fase posterior ao estro, caracterizada pela ovulação do folículo dominante e pela formação do corpo lúteo, tendo uma duração média de 4 a 5 dias. Durante essa fase, ocorre uma depressão no local do folículo ovulatório, resultando na formação do corpo hemorrágico. À medida que os níveis de progesterona atingem valores superiores a 1ng/ml, por volta do quarto dia do metestro, indica-se o fim dessa fase e o início do diestro. É

importante ressaltar que o diestro é uma fase do ciclo estral em que os níveis de progesterona são mantidos elevados, preparando o útero para a gestação (SILVA, 2020).

O diestro representa a etapa de maior extensão no ciclo reprodutivo bovino, com uma duração de 12 a 14 dias. Durante esse período, o corpo lúteo está em sua fase de maior secreção de progesterona, em quantidades superiores a 1ng/ml, liberadas para o endométrio. Após aproximadamente 14 dias de exposição à progesterona, caso não ocorra fecundação, o endométrio começa a gerar pulsos de Prostaglandina-2 α (PGF₂ α), resultando na regressão do corpo lúteo e no início de um novo ciclo (SILVA, 2021). A figura 2 apresenta um esquema representativo do ciclo estral em bovinos.

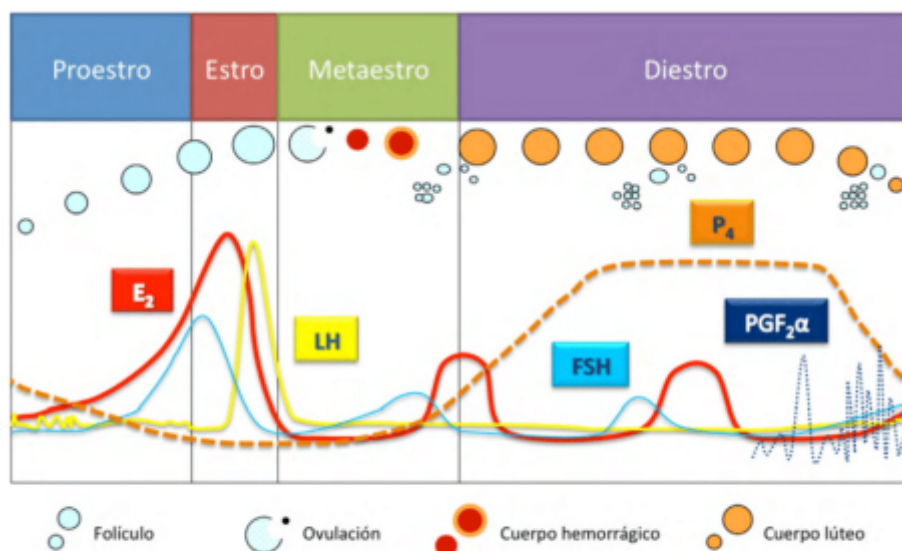


Figura 2: Representação gráfica do ciclo estral em bovinos, ilustrando as fases do proestro, estro, metaestro e diestro, indicando os níveis hormonais associados ao processo reprodutivo.

Fonte: SILVA (2021).

4.1.4 Nutrição

Além de uma boa genética, o motivo ao qual possibilita que esses animais possam expressar todo o seu potencial genético é a nutrição, que compõem a base do bem estar animal sendo um dos principais fatores que influenciam no desenvolvimento corporal e reprodutivo deste animal. Vale lembrar que o animal é aquilo que ele come, pois a nutrição se expressa de forma direta no desempenho do animal, a deficiência de alguns nutrientes como por exemplo o fósforo (P), zinco (Zn), cobre (Cu), cobalto (Co), iodo (I), sódio (Na) e selênio (Se), causam uma maior propensão a esses animais serem mais sensíveis a infecções, pois a falta desses nutrientes deprime o sistema imunológico o tornando mais susceptível às infecções

oportunistas e as quais se aproveitam desta baixa imunitária para se multiplicar. Outra importante parte que é que afeta a parte reprodutiva, essa deficiência nutricional influencia no desenvolvimento gestacional tanto da mãe quanto do embrião interferindo na replicação e maturação celular(EMBRAPA 2008)

4.1.5 Novas tecnologias

A TE tem passado por significativos avanços ao longo dos anos, impulsionados pelo desenvolvimento de novas tecnologias e técnicas, assim têm contribuído para a otimização da técnica, o aumento da taxa de prenhez, melhoramento genético e ganhos financeiros na pecuária bovina. Com o aprimoramento contínuo da TE, a indústria da pecuária se beneficia não apenas de uma reprodução mais eficiente, mas também da capacidade de selecionar e disseminar as melhores características genéticas, impulsionando o progresso genético e a competitividade no mercado.

Diversas tecnologias estão sendo estudadas e muitas já estão consolidadas no mercado, tais como a aspiração folicular (OPU), fertilização *in vitro* (FIV) e a utilização de embriões congelados. Esta última inovação, em particular, tem proporcionado benefícios significativos, simplificando o transporte e minimizando os riscos sanitários associados à TE (PILLA, 2005).

No mercado atual, existem dois tipos distintos de embriões congelados disponíveis: os embriões de Transferência Direta (DT) e os embriões vitrificados (BASTOS et al., 2022). O processo de congelamento e descongelamento para esses dois tipos de embriões difere consideravelmente. Os embriões DT são congelados de forma lenta, em que no momento da inovulação, estão prontos para serem transferidos imediatamente após o descongelamento, passando por um processo de descongelamento simplificado que não requer o uso de laboratório adicional (BASTOS et al., 2022). Essa técnica é amplamente valorizada devido à sua simplicidade e menor demanda por recursos especializados. Em contrapartida, os embriões vitrificados exigem um processo mais complexo durante a desvitrificação, demandando um laboratório para realizar o descongelamento, separação e envase dos embriões antes da transferência (BASTOS et al., 2022).

Enquanto isso, no âmbito da biotecnologia reprodutiva, outra técnica inovadora tem se destacado. De acordo com Rocha (2007), a sexagem de embriões permite a identificação do sexo do embrião após a sua coleta do útero da doadora. O procedimento envolve a punção do

embrião com 7 dias de desenvolvimento, seguida da retirada de um fragmento que é posteriormente analisado em laboratório por meio da técnica de eletroforese.

Gregianini et al. (2022) abordaram a viabilidade da utilização de sêmen sexado na produção de embriões in vitro, pois com isso diminui a necessidade de sexagem do embrião, sendo necessário fazer a sexagem somente pela ultra sonografia após 60 a 90 dias de prenhez para confirmar o sexo. No entanto, observou-se que essa abordagem pode resultar em menor eficiência reprodutiva devido aos desafios associados ao processo de separação dos espermatozoides em que durante esse procedimento, as células espermáticas são expostas a diversos tipos de estresses, incluindo estresses mecânicos e químicos.. Esse cenário muitas vezes resulta em uma taxa de desenvolvimento embrionário inferior quando comparado à utilização de sêmen convencional.

Por outro lado, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa introduziu uma nova técnica em 2016. Que, embora não tenha sido amplamente estudada, apresentou resultados promissores no contexto da transferência de embriões. A técnica de Transferência Intrafolicular de Oócitos Imaturos (TIFOI) em bovinos emergiu como uma terceira abordagem para a produção de embriões. Esta técnica combina as vantagens da produção in vitro e in vivo de embriões, permitindo a geração de um grande número de embriões sem a necessidade de hormônios ou estruturas laboratoriais sofisticadas (SPRÍCIGO e DODE, 2016).

Para remover os oócitos imaturos, realiza-se a aspiração folicular nas fêmeas doadoras. Após essa etapa, os oócitos são implantados no folículo dominante de uma fêmea ovuladora, seguido imediatamente pela realização da IA. Durante esse processo, ocorre o amadurecimento dos oócitos até chegar ao momento da ovulação e serem fecundados. Os embriões resultantes são colhidos oito dias após a inserção dos oócitos, por meio do procedimento de lavagem uterina. Em seguida, realiza-se a transferência dos embriões para as receptoras ou, alternativamente, é possível optar pela criopreservação (SILVA et al., 2021). Esta biotecnologia representa uma inovação significativa, uma vez que os embriões produzidos por meio dela demonstram maior resistência em comparação com os gerados pela Fertilização in vitro (FIV), e essa maior resistência se deve ao fato de que esses embriões são produzidos e amadurecidos naturalmente no órgão reprodutor da fêmea, seguindo processos fisiológicos normais. Além disso, essa técnica pode ser notavelmente mais econômica, com custos estimados de 2 a 3 vezes inferiores aos da FIV ou da Superovulação (SOV), uma vez que dispensa a necessidade de instalações laboratoriais e o uso de Hormônio folículo estimulante (FSH) em vacas ovuladoras (SPRÍCIGO e DODE, 2016).

Existem algumas desvantagens associadas à TIFOI e uma delas está relacionada ao fato de que um dos embriões resultante será geneticamente proveniente da própria vaca ovuladora. Isso significa que, se forem injetados, por exemplo, 20 oócitos no folículo dominante, teremos um total de 21 embriões, incluindo o ovócito da própria vaca ovuladora. Esse embrião irá nascer com as características genéticas da vaca ovuladora, não da doadora. Para determinar a origem genética do embrião, é necessário realizar o teste de paternidade de DNA após o nascimento (SPRÍCIGO e DODE, 2016). Outra desvantagem está relacionada ao fato de que a TIFOI ser uma biotecnologia relativamente nova, com poucos estudos realizados sobre a técnica.

Também é evidente o aprimoramento da seleção de doadoras e receptoras por meio de avanços na ultrassonografia e na avaliação dos oócitos, permitindo uma escolha mais precisa dos animais. Além disso, a utilização de equipamentos cada vez mais sofisticados, como aplicadores com travas automáticas, bainhas, ultrassonografia utilizando doppler, camisinhas sanitárias, descongeladores eletrônicos e transportadores de embriões, está desempenhando um papel fundamental na eficiência e na segurança dos procedimentos da TE.

4.2 Técnicas e procedimentos na Transferência de Embriões em Bovinos

4.2.1 Seleção de doadoras

Para alcançar o sucesso na TE e garantir retornos financeiros satisfatórios, a seleção criteriosa das doadoras desempenha um papel crucial, seja na SOV ou na OPU. Os critérios para a seleção de uma doadora reside na escolha de animais com genética superior e alto mérito genético. Além disso, a seleção de doadoras pode ser orientada pelo mercado específico de uma determinada raça, adequação ao clima, classificação industrial, ou mesmo pela preferência pessoal do produtor e seu desejo de aumentar a prole de um animal em particular. Adicionalmente, fatores como lactação, paridade, precocidade sexual, influências endócrinas e habilidade materna devem ser cuidadosamente considerados no processo de seleção (HOPPER, 2015).

Ainda, ressalta-se que para alcançar o objetivo de realizar a superovulação das doadoras, é essencial selecionar animais com sistemas reprodutivos saudáveis e apresentando ciclos estrais regulares. Portanto, é importante descartar qualquer animal que apresente defeitos congênitos ou adquiridos no trato reprodutivo, tais como cérvix tortuosa, útero subdesenvolvido, canal vaginal estreito ou estenosado, aderências, endometrites, tumores ou

qualquer outra condição que possa interferir no desenvolvimento da técnica (OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, é fundamental que as doadoras estejam bem nutridas, mineralizadas e com vacinações em dia e livres de doenças infectocontagiosas, especialmente aquelas que podem afetar negativamente o desempenho reprodutivo, como a brucelose, leptospirose, diarreia viral bovina (BVD) e rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) (DOMINGUES; LANGONI, 2001).

3.2.2 Aspiração intrafolicular de oócitos

A aspiração folicular apresenta grande flexibilidade uma vez que se pode obter oócitos de uma fêmea a partir dos 6 meses de idade, vacas prenhes até o terceiro mês de gestação e entre 2 e 3 semanas pós-parto (BUENO, 2008). A aspiração folicular torna possível uma maior proliferação genética de um único animal, pois fisiologicamente a fêmea bovina nasce com um número pré-determinado de folículos, desses só um chega a fase ovulatória, os outros regridem. Com a utilização desta técnica, é possível um maior aproveitamento dos mesmos a qual estes folículos imaturos são capturados, selecionados, capacitados e fertilizados artificialmente (BARUSELLI E MADUREIRA, 2000).

De acordo com Seneda (2002), uma técnica que permite o aproveitamento de oócitos de animais vivos é a laparoscopia, podendo ela ser transvaginal ou para-lombar. Ao decorrer de sua revisão, Seneda et al. (2022) cita técnicas, como a colpotomia, a qual os ovários são manipulados através de uma incisão intravaginal. Contudo, os riscos limitaram o uso desta técnica, e com isso, o surgimento de nova técnica já com o uso da ultrassonografia.

Atualmente a técnica mais utilizada para recuperação de oócitos é a de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (Ovum pick-up-OPU) (BUENO, 2008). Esta técnica apresenta maior número de embriões produzidos por doadora, isto devido a alta taxa de repetibilidade possibilitando maior recuperação de oócitos (RIBEIRO et al, 2011). É importante ressaltar que, de acordo com GOUVEIA, BUENO e BELTRAN (2011; 2008), uma das vantagens da utilização da OPU está no fato de não ser necessário o uso de hormônios para a recuperação de oócitos.

Os oócitos recuperados através da OPU passam por um processo de seleção de acordo com a camada de células do cumulus oophorus e de acordo com os aspectos do citoplasma e membrana (BUENO, 2008). Após a recuperação dos oócitos imaturos e seleção, estes são mandados ao laboratório para o início da PIVE (GOUVEIA 2011).

4.2.3 Produção “in vitro” de embriões bovinos para Transferência de Embriões

Segundo Bueno (2008), a produção in vitro de embriões teve início no Brasil no ano de 1998 e se trata de uma técnica assistida que consiste na preparação e cultivo dos gametas em ambiente laboratorial para geração do zigoto e seu cultivo até o estágio desejado para sua transferência (GUARDA, 2023). Dentro da técnica vários procedimentos são integrados, envolve os trabalhos realizados a campo e no laboratório, sendo sequencialmente: avaliação de doadoras, avaliação de receptoras, obtenção de oócitos, maturação in vitro, fertilização in vitro, cultivo in vitro, transferência de embriões, diagnóstico precoce de gestação e sexagem fetal (GOUVEIA, 2011). A PIVE vem sendo introduzida gradativamente nos programas de melhoramento animal como técnica de multiplicação, sendo que seu uso tem aumentado significativamente no país (GOUVEIA, 2011), de forma que a PIVE vem sendo a complementar a TE (BUENO 2008).

4.2.4 Protocolos de superovulação usados em doadoras

É sabido que os protocolos empregados na superovulação das fêmeas visam alcançar o maior número possível de oócitos e embriões transferíveis, cujo objetivo é aumentar substancialmente a probabilidade de gestação em fêmeas reprodutoras (SANTOS, 2017). Atualmente, existem protocolos de SOV amplamente estabelecidos no mercado, que podem ser fundamentados na administração de gonadotrofina coriônica equina (eCG) em dose única ou Hormônio Folículo Estimulante (FSH) em oito doses decrescentes. Esses protocolos têm a capacidade de serem aplicados em larga escala, com o propósito de otimizar a eficiência reprodutiva e aprimorar o ganho genético do rebanho (MELO et al., 2023).

O emprego de FSH em doses decrescentes tem como finalidade atenuar a queda fisiológica deste hormônio durante a fase folicular. Após três dias do início do protocolo, a administração de Prostaglandina 2 alfa (PGF2 α) é incorporada com o propósito de reduzir os níveis de Progesterona (P4), suprimir o pico do Hormônio Luteinizante (LH) e induzir a ovulação (PENITENTE FILHO et al., 2014). No entanto, neste protocolo convencional de superovulação, a administração de gonadotrofinas é iniciada na metade do ciclo estral, aproximadamente 8-10 dias após a ovulação, tornando essencial a detecção do cio para o início do protocolo (BARUSSELI et al., 2008). A Tabela 1 abaixo apresenta de forma ilustrativa o protocolo de superovulação de acordo com a detecção natural do cio.

Tabela 1 - Protocolo de SOV baseado em observação do cio natural com associação de FSH e PGF2 α .

Dia	0	10	11	12	13	14	15
Manhã	CIO	FSH	FSH	FSH e PGF2 α	FSH	CIO	IA
Tarde		FSH	FSH	FSH e PGF2 α	FSH	IA	

Fonte: Penitente Filho et al. (2014).

Por outro lado, a combinação de Progesterona (P4) com o Estrogênio (E2) representa um avanço significativo na SOV ao possibilitar o início do processo em qualquer fase do ciclo estral sem a necessidade de detecção de cio, uma vez que sincroniza o início da onda folicular. O E2, quando administrado juntamente com a aplicação intramuscular de P4 e o implante intravaginal de P4, desempenha a função de suprimir o desenvolvimento folicular devido ao feedback negativo provocado pela P4, promovendo assim o início de uma nova onda folicular (PENITENTE FILHO et al., 2014). A Tabela 2 abaixo apresenta de forma ilustrativa o protocolo de superovulação por meio da combinação de FSH, E2, P4, CIDR e PGF2 α .

Tabela 2 - Protocolo de SOV com a combinação de FSH, E2, P4, CIDR e PGF2 α .

Dia	0	4	5	6	7	8	9
Manhã	P4 + E2 + CIDR	FSH	FSH	FSH	FSH - Retirada do CDR	CIO	IA
Tarde		FSH	FSH	FSH e PGF2 α	FSH	IA	

Fonte: Penitente Filho et al. (2014).

No entanto, nem sempre a ovulação de todos os folículos está sincronizada nos procedimentos de SOV. Em algumas situações, pode haver dificuldade em acertar o momento das inseminações, resultando na recuperação de alguns ovócitos não fecundados. É possível que alguns folículos superestimulados com FSH não ovulam devido à ausência de receptores de LH, não respondendo à onda pré-ovulatória. No entanto, estratégias têm sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a quantidade de embriões (PENITENTE FILHO et al., 2014). Nesse contexto, o uso de GnRH ou LH tem se mostrado uma ferramenta essencial

para controlar a ovulação em tempo fixo no final desses protocolos, como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Protocolo de SOV baseado no cio natural, com associação de FSH, PGF2 α e GnRH/LH para a ovulação em tempo fixo.

Dia	0	10	11	12	13	14	15
Manhã	CIO	FSH	FSH	FSH e PGF2 α	FSH	GnRH + LH	IA
Tarde		FSH	FSH	FSH e PGF2 α	FSH	IA	

Fonte: Penitente Filho et al. (2014).

Após a superovulação é realizada a inseminação artificial para posteriormente no 7-8 dia ser feita a recuperação dos embriões.

4.2.5 Técnica de recuperação de embriões via transcervical

A colheita de embriões é realizada preferencialmente entre o sexto e oitavo dia após a primeira inseminação das doadoras, pois neste período o embrião encontra-se flutuante no lúmen das pontas dos cornos uterinos o que permite sua captação por meio de lavagem dos cornos (DEMÉTRIO, 2003; HONORATO, 2013; PASA, 2008; PAZZIM, 2021).

Para a técnica de colheita de embriões por via transcervical em método fechado Honorato et al., (2013); Pasa, (2008); Pazzim, (2021) refere-se ao uso de materiais específicos, como: Sonda de Foley, mandril rígido, equipo em “Y”, seringa descartável, Phosphate Buffer Saline (Solução Salina Tampão Fosfato; PBS), copo/ filtro coletor de embriões.

Para o início do procedimento é necessário que haja o preparo do animal com uma contenção segura em um tronco de contenção. É feita a infusão no volume de 3 à 7 ml de Lidocaína via epidural baixa para que haja uma dessensibilização da região perineal e uterina (OLIVEIRA et al., 2014; PASA, 2008). Após, é feita a antisepsia da região perineal. Com o animal preparado em estação e o material em mãos, é possível dar início ao procedimento. É feito a introdução da Sonda de Foley no trato reprodutor da fêmea com um mandril inserido em seu lúmen e sendo auxiliada via palpação transretal. Após a passagem da extremidade cranial da sonda pela cérvix, a mesma é conduzida até o primeiro corno a ser feito a colheita

dos embriões, é retirado o mandril e fixada no corno uterino com o preenchimento do Cuff da sonda com a infusão de 10 a 20ml de ar, isso dará mais segurança e impedirá eventuais refluxos. Após a fixação da sonda de Foley, pluga-se um equipo de duas vias em forma de “Y” de modo que cada sonda possui um registro para controle de entrada e saída de fluido. Em uma das extremidades do equipo se tem 1000ml de solução PBS para infusão nos cornos uterinos, esta ocorre por gravidade de forma que o recipiente é posicionado cerca de 1 metro acima da garupa do animal. Na extremidade oposta tem-se o copo coletor de embriões para filtragem do lavado, onde será retido apenas os embriões assim desprezando o restante do material. O método é realizado separadamente, ou seja, se repete no corno contralateral, de forma que cada um seja lavado por várias vezes até que se use toda a solução PBS (1000 ml), com o objetivo de se recuperar uma maior taxa de embriões (LIMA, 2018; PASA, 2008; PAZZIM, 2021). Neste contexto podemos observar a esquematização da técnica nas figuras 3 e 4.

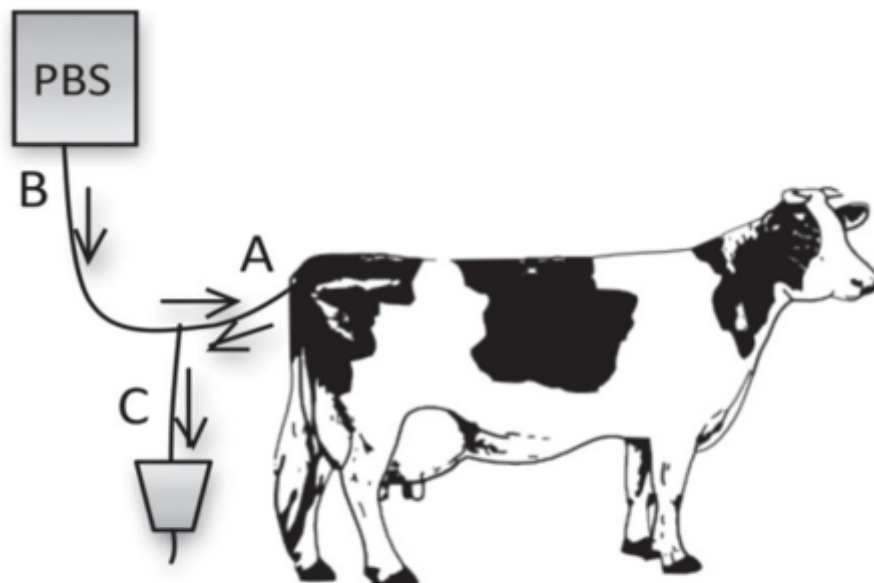


Figura 3. Esquema fechado para colheita e embriões. A) Sonda de foley; B) PBS na extremidade do equipo em “Y”; C) Filtro coletor de embriões na extremidade do equipo em “Y”. B e C formando equipo em “Y”. Fonte: OLIVEIRA et al., 2014.

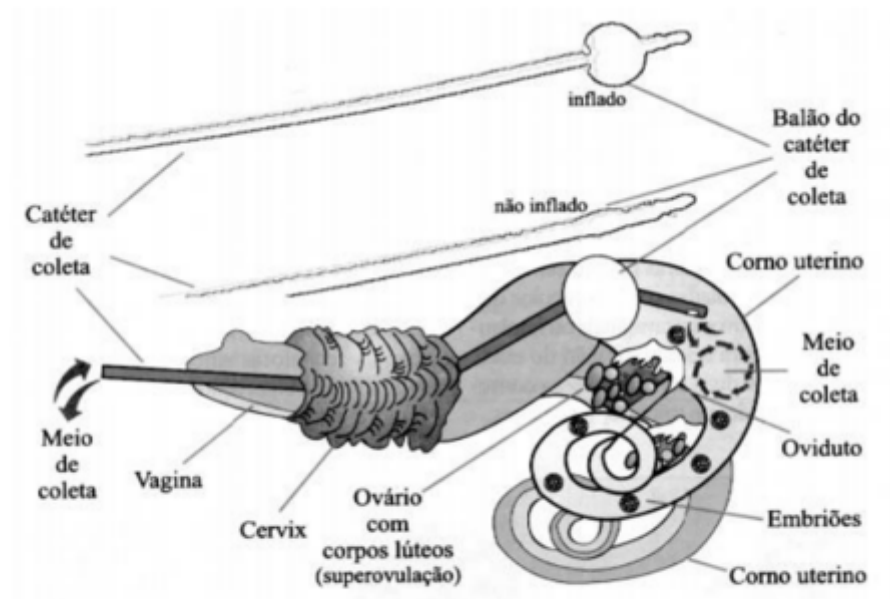


Figura 4. Desenho esquemático da lavagem uterina; demonstrando o posicionamento da sonda de foley. Fonte: LIMA, 2018

Em uma pesquisa publicada pela EMBRAPA, Machado et al., (2009), relata que a lavagem uterina executada simultaneamente nos dois cornos teve um fluxo de aproximadamente 50 a 60 ml de meio de colheita por vez, ou seja, por cada retirada de fluido por vez, até completar o uso das 1000ml de solução de lavado (PBS) utilizado por vaca.

Alguns trabalhos retratam um método mais facilitado de colheita de embriões, onde, ao invés de se fazer fixação e a lavagem dos cornos separadamente, este é feito de forma a fixar a sonda de foley após a cérvix no corpo do útero para que haja lavagem simultânea dos dois cornos uterinos (MACHADO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014; PENITENTE FILHO et al., 2014).

Em um experimento realizado por Wünsche Júnior e colaboradores (2008) com o intuito de se testar uma hipótese, o autor faz uma avaliação de uma segunda lavagem uterina utilizando método fechado após 24 horas de ter feito uma primeira lavagem na intenção de melhorar a taxa de recuperação de embriões, e conclui que a hipótese se confirma podendo incrementar em até 8% o número de embriões obtidos em uma segunda lavagem. Contudo, pelo acréscimo reduzido na taxa de recuperação dos embriões, a prática se limita a recuperação de embriões com elevado valor agregado pelo aumento de trabalho e custo do procedimento.

Ao fim da colheita, o cuff da sonda de foley é desinflado e a mesma é retirada. Recomenda-se o uso de uma dose de PGF2 α para evitar gestações indesejadas (LIMA, 2018; PAZZIM, 2021).

4.2.6 Seleção de embriões

Após a recuperação destes embriões, os mesmos são removidos do filtro de colheita para uma placa de petri com medida de 12cm. Fazendo movimentos circulares leves e com o auxílio do estereoscópio (aumento mín. 40x) usando uma seringa de insulina acoplada a uma ponteira estéril, é feita uma primeira busca e seleção onde são separados de quaisquer outras células ou estruturas, transferindo-os para uma outra placa menor (60x35) contendo dez gotas do meio de manutenção Albumina Sérica Bovina (BSA). Desta forma realiza-se de forma a realizar a lavagem dos embriões (HONORATO et al., 2013; PASA, 2008). De acordo com Pazzim, (2021) os embriões devem passar por todas as gotas (7-10 gotas) espalhadas na placa a fim de diminuir a possibilidade de contaminação, e em seguida inicia-se a classificação embrionária.

Para estimar a viabilidade dos embriões usa-se atualmente a avaliação morfológica (PAZZIM, 2021). A avaliação morfológica trata-se de uma classificação indicativa do potencial de desenvolvimento dos embriões (VIANA, 2009). É importante para diferenciar os oócitos não fertilizados de embriões, determinar a qualidade do embrião, identificar anormalidades e determinar se o estágio do desenvolvimento é consistente com a idade do embrião (PAZZIM, 2021). A figura 4 demonstra o estágio de desenvolvimento de um embrião de acordo com a IETS.

Na avaliação morfológica de um embrião considera-se com relação às estruturas e qualidades os seguintes aspectos: Forma esferóide, simetria dos blastômeros, aparência clara e nítida dos blastômeros; tonalidade escura e uniforme; uniformidade da membrana celular, proporcionalidade entre o embrião e fragmentos celulares no espaço perivitelino, ausência de fragmentos celulares aderidos à zona pelúcida, compactação dos blastômeros entre si (HONORATO, M.T. et al.2013; PAZZIM, 2021).

A evolução morfológica dos embriões é um dos passos mais importantes para o sucesso da transferência. Ressalta-se que uma rigorosa seleção dos embriões por meio de sua evolução morfológica aumenta a taxa de concepção nas receptoras. Há outros fatores envolvidos neste processo que podem levar ao insucesso desse procedimento, como, defeitos

genéticos, contaminação e outros defeitos intrínsecos como má formação do núcleo e do citoplasma do embrião o'que podem condenar esse embrião ao fracasso (PASA, 2008).

				<p>Mórula Fase esperada: dias 5,5-6,0 do ciclo Características: Blastômeros ainda evidentes, porém não é mais possível determinar número exato. Massa de células ocupa maior parte do espaço dentro da zona pelúcida. Período caracterizado pelo fim da fase de celularização e da transição materna zigótica e início do processo de compactação.</p>
<p>8 – 12 Células Código IETS: 2</p>		<p>Mórula Código IETS: 3</p>		
				<p>Mórula Compacta Fase esperada: dias 6,0 a 6,5 do ciclo Características: Compactação torna a massa de células coesa, dificultando individualização dos blastômeros, e causa retração do embrião em relação à zona pelúcida, com aumento do espaço perivitelínico. Formação de junções de adesão e de oclusão entre as células, preparando o embrião para a formação da blastocélula.</p>
<p>Mórula Compacta Código IETS: 4</p>				
				<p>Blastocisto Inicial Fase esperada: dias 6,5 a 7,0 do ciclo Características: Blastômeros criam gradiente osmótico que atrai água para o espaço intercelular, iniciando a formação de uma cavidade denominada blastocélula. Perda da totipotência, com a formação de duas populações celulares distintas: o trofoblasto, que reveste a blastocélula, e a massa celular interna (MCI), lateral à blastocélula.</p>
<p>Blastocisto Inicial Código IETS: 5</p>				
				<p>Blastocisto Fase esperada: dias 7,0 a 7,5 do ciclo Características: Blastocélula aumenta de tamanho, tornando-se proporcionalmente maior que a massa celular interna e ocupando gradualmente todo o espaço perivitelínico. Trofoblasto sofre diferenciações morfológicas e funcionais associadas à captação de nutrientes, enquanto as células da MCI mantêm potencialidade.</p>
<p>Blastocisto Código IETS: 6</p>				
				<p>Blastocisto Expandido Fase esperada: dias 7,5 a 8,0 do ciclo Características: Expansão do blastocélula causa aumento de tamanho do embrião e progressiva redução na espessura da zona pelúcida (ZP). Maior desenvolvimento do trofoblasto, a MCI é viável dependendo da posição do embrião. Rompimento da ZP caracteriza a eclosão, com o embrião entrando em contato direto com os tecidos maternos.</p>
<p>Blastocisto Expandido Código IETS:</p>		<p>Blastocisto Eclodido Código IETS: 8</p>		

Figura 5. Avaliação das variações morfológicas do embrião de acordo com seu estágio de desenvolvimento.

Fonte: Viana, 2009

Assim, os embriões são submetidos a uma análise na qual suas características morfológicas e viabilidade são avaliadas. Essa avaliação é classificada numericamente, como descrito na figura 5, variando de 1 a 4. O valor 1 é atribuído a embriões de excelente ou boa qualidade, enquanto o valor 4 é associado a embriões mortos ou degenerados. (VIANA, 2009).

Nesta avaliação serão levados em conta o formato do embrião, a simetria dos blastômeros, uniformidade da membrana celular, aparência clara e nítida dos blastômeros, tonalidade escura e uniforme, proporcionalidade entre o embrião e fragmentos celulares no espaço perivitelino, ausência de fragmentos celulares aderidos à zona pelúcida e compactação dos blastômeros entre si. São estas as características as quais os embriões devem atender para serem aptos ao congelamento ou transferência a fresco (HONORATO, M.T. et al.2013).

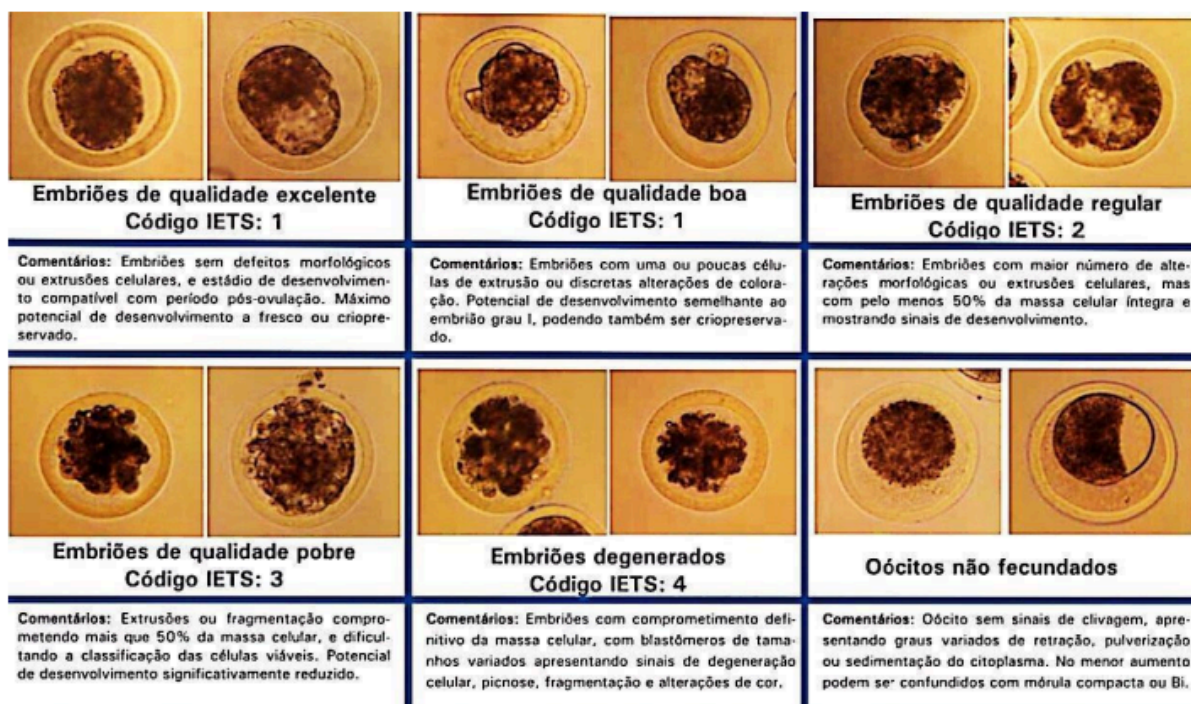


Figura 6. Classificação morfológica dos embriões.

Fonte: Viana, 2009.

4.2.7 Técnica implantação de embriões nas receptoras

Um dos fatores críticos para o sucesso na técnica de TE é a seleção e sincronização adequada das receptoras. É essencial que as receptoras estejam em sincronia com o ciclo estral da doadora, o que requer uma seleção criteriosa das doadoras e a implementação de protocolos hormonais precisos (BRANDÃO, 2019).

As receptoras, assim como as doadoras, devem ser submetidas a uma seleção rigorosa, na qual aspectos cruciais devem ser avaliados. Estes incluem a condição de escore corporal, que não deve estar em excesso, evitando a inclusão de animais extremamente magros ou obesos. Além disso, é essencial avaliar a integridade dos aprumos e a qualidade dos cascos,

verificar a saúde do aparelho reprodutor e da vulva do animal, assim como avaliação ginecológica completa, controlar endo e ectoparasitas, garantir a atualização de todas as vacinações, especialmente as reprodutivas, avaliar a habilidade materna e realizar exames ultrassonográficos para uma avaliação detalhada do trato reprodutivo. Esta última abordagem ajuda a descartar animais que possam não responder adequadamente ao protocolo hormonal de sincronização (DANTAS et al., 2018).

Geralmente é usado receptoras jovens cruzadas, raças zebu x taurino, agregando características de boa conversão alimentar, alta fertilidade e boa habilidade materna (PENITENTE FILHO, 2011).

Um exemplo de protocolo hormonal amplamente utilizado para preparar receptoras são os protocolos comumente empregados na sincronização para IATF. De acordo com Dantas e colaboradores (2018) neste protocolo, no Dia 0 (D0), é inserido um dispositivo intravaginal com liberação lenta de P4, além da aplicação intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol (BE). No Dia 8 (D8), ocorre a retirada do dispositivo de progesterona, seguida pela aplicação intramuscular de 2mg de PGF2 α , 1mg de eCG e 1mg de cipionato de estradiol (ECP). Em seguida, no Dia 17 (D17), ocorre a transferência do embrião.

Para a realização da transferência de embriões, podem ser utilizados três tipos diferentes: embriões frescos, embriões Direct Transfer (DT) ou embriões vitrificados. No caso dos embriões frescos, o transferidor emprega um transportador especial que mantém o embrião na temperatura ideal para evitar qualquer dano. Já no uso de embriões DT, é necessário descongelar o embrião seguindo o manual específico de cada laboratório que realizou a FIV, pois os procedimentos podem variar de cada laboratório, sendo temperatura (26°C a 30°C) e tempo de mínimo para descongelamento (26 a 30 segundos). Por fim, no caso dos embriões vitrificados, eles também estão congelados, mas o processo de descongelamento é mais minucioso e envolve etapas mais lentas do que os embriões DT.

No método transcervical, realiza-se uma palpação transretal da receptora para identificar em qual ovário está localizado o corpo lúteo. Nesse contexto, destaca-se a importância da utilização da ultrassonografia para avaliar a condição do corpo lúteo, classificando-o como excelente, bom ou ruim (SPELL et al., 2001). Em seguida, é administrada anestesia epidural baixa para evitar movimentos excessivos durante o procedimento. Com condições antissépticas, o embrião, já envasado em uma palheta de 0,25ml, é colocado em uma bainha e posteriormente o inovulador é encaixado. Deve ser levado em consideração a importância do uso de camisinhas sanitárias para prevenir a contaminação do útero da receptora. A vulva do animal deve ser previamente higienizada. Em

seguida, o inovulador é inserido na vagina e avança através da cérvix com o auxílio de manipulação retal. Durante a passagem pela cérvix, a camisinha sanitária é rompida, permitindo que o aplicador entre no útero sem risco de contaminação. Posteriormente, o inovulador é direcionado ao corno uterino ipsilateral e ao corpo lúteo. Nesta etapa, o conteúdo da palheta é depositado no terço final do corno uterino da receptora (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

5 CONCLUSÃO

A crescente adoção de biotecnologias na reprodução animal, como a TE, tem impulsionado avanços significativos na pecuária, resultando na agregação de valor genético e aprimoramento da qualidade dos animais. Nossa análise abordou avanços tecnológicos essenciais para o sucesso da TE, incluindo novos protocolos, sexagem de embriões, além do uso de embriões congelados DT e vitrificados. A implementação de equipamentos avançados e a seleção criteriosa de doadoras e receptoras emergem como fatores cruciais para maximizar os resultados reprodutivos. Porém, a chave para o sucesso da TE reside na execução correta das técnicas. Isso ressalta a importância do conhecimento técnico especializado dos profissionais envolvidos. Portanto, ressalta-se a necessidade contínua de capacitação e atualização dos profissionais que aplicam essas biotecnologias de reprodução, garantindo a eficiência e a sustentabilidade dessas técnicas inovadoras nas operações pecuárias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H. Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes. 2000, **Anais..** São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, 2000.
- BARUSSELI, P.S. et al. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. **Biotecnologia de reprodução em bovinos (3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada)**. 2008.
- BRANDÃO, G.V.R. **Revisão de Literatura: Transferência de Embrião em Bovinos**. Curitiba-SC, 2019.
- BUENO, A.P.; BELTRAN, M.P.; Produção in vitro de embriões bovinos. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**. ISSN 1679-7353, ano VI, n.11, Julho, 2008.
- CAETANO, S.G; SILVA, N.V.S. **Inseminação artificial de bovinos em tempo fixo (IATF) – Revisão de literatura**. UNIFUCAMP, Monte Carmelo- M.G, Junho, 2023.
- CARVALHO, V.H.S. et al. Impactos das biotécnicas da reprodução animal e o melhoramento genético na pecuária de corte. **PUBVET**, São Luis De Montes Belos, v.17, n.8, p.1-10, 2023
- DANTAS, K.S.A.; NUNES, C. C. C.; FERREIRA, J.; DANTAS, R. A. A. Seleção de receptoras em um programa de transferência de embriões (PIVE) em bovinos no Nordeste do Brasil. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 28, p. 1-14, 2018.
- DA SILVA, Emanuel Isaque Cordeiro. **Fisiologia Clínica do Ciclo Estral de Vacas Leiteiras: Desenvolvimento Folicular, Corpo Lúteo e Etapas do Estro**. 2020.
- DA SILVA, Emanuel Isaque Cordeiro. **Fisiologia da Reprodução de Bovinos Leiteiros: Aspectos Básicos e Clínicos**. Emanuel Isaque Cordeiro da Silva, 2022.
- DA SILVA, Emanuel Isaque Cordeiro. **Fisiologia do ciclo estral dos animais domésticos**. Emanuel Isaque Cordeiro da Silva, 2021.
- DA SILVA, Emanuel Isaque Cordeiro. **Transferência de Embriões nos Animais e a Indústria de Embriões no Brasil**.
- DIAS, L.R.O. **Fatores que afetam a produção de embriões pela Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI) em bovinos**. 2021. 85 f. Tese (Doutorado em [nome do programa]) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2021.
- DOMINGUES, P.F.; LANGONI, H. **Manejo Sanitário Animal**. Editora de Publicações Biomédicas Ltda - EPUB, Rio de Janeiro, 2001. 209 p.
- EMBRAPA. **MINERAIS NA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE BOVINOS**. SÃO CARLOS- SÃO PAULO 2008.
- FIDELIS, C.A.S. **Inseminação artificial em tempo fixo intracornual profunda em bovinos**. Dissertação (mestrado acadêmico). Araguaína - TO, 2019.

GONÇALVES, R.L.R.; VIANA, J.H.M. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. In: **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 2019, Gramado, RS, 2019, p. 156-159.

GOUVEIA, F.F. **A Produção in vitro de embriões Bovinos**. Monografia (Conclusão do curso de Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2011.

GREGIANINI, J.T.F. et al. Avaliação de embriões bovinos utilizando sêmen sexado e convencional. In: SEMINÁRIO DA EMBRAPA ACRE DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E PÓS-GRADUAÇÃO, 4., 2021, Rio Branco, AC. Atividades agropecuárias e florestais para o desenvolvimento sustentável da Amazônia: **Anais...** Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2022. Pôster.

GUARDA, A.C.A. **Biotecnologia na reprodução animal: Uma visão teórico/prática de produção in vitro de embriões bovino**. 2023. 28p. Trabalho de Conclusão de curso (Bacharelado de Zootecnia). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde, Rio Verde, GO, 2023.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ. **Reprodução animal** / [coordenador de tradução da 7. ed. original Renato Campanarut Barnabe]. – Barueri, SP : Manole, 2004, il.;

HONORATO, M.T. et al. Importância da escolha de receptoras em um programa de transferência de embriões em bovinos. **PUBVET**, Londrina, V. 7, N. 19, Ed. 242, Art. 1601, Outubro, 2013.

HOPPER, R.M. **Bovine Reproduction**. Wiley Blackwell, Capítulo 78, p. 723-733, 2015.

LIMA, Fabio Junior Arruda. **Transferência de embriões em tempo fixo em bovinos: Relato de Caso**. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação em medicina veterinária)- Universidade Federal de Santa Catarina-Campus Curitibanos. Curitibanos, 2018.

MACHADO, R. et al. **Metodologia para obtenção de conceito bovino**. Embrapa Pecuária Sudeste, ISSN 1981-2078, São Carlos-SP, 2009. Disponível em:. Acessado em 11 de outubro, 2023

BASTOS, M.R. et al. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. In: MENDONÇA, P. P. et al. (Org.). **Tópicos Especiais em Ciência Animal XI**. 1. ed. Alegre: CAUFES, 2022. Capítulo 13.

MELO, R. et al. Utilização de ECG e FSH em protocolos de superovulação em bovinos. **Manejo, Nutrição e Produção Animal: Tópicos Atuais em Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 110-116, 2023.

OLIVEIRA, C.S. et al. **Biotécnicas da Reprodução em Bovinos**. EMBRAPA, 2014.

PASA, C. Transferência de embriões em bovinos. **Biodiversidade**, v. 7, n. 1, 2008.

PAZZIM, L.V.L. **Transferencia de embriões em bovinos: Revisão de literatura**. Monografia (Trabalho conclusão de curso) - Universidade federal de Santa Catarina. Curitibanos, 2021.

PENITENTE FILHO, J.M. et al. Produção de embriões bovinos in vivo e in vitro. **Revista CFMV**, Ano XX, p. 73-82, 2014.

PENITENTE FILHO, J.M. **Produção de Embriões Bovinos In Vivo e In Vitro**. 2011. 22 f. Monografia (Especialização) - Curso de Medicina Veterinária, UFV, Viçosa, 2011.

PILLA, L.F.C. **Congelamento ultra-rápido de embriões bovinos com etilenoglicol associado ou não a trealose**. 2005. 37f. Dissertação (Mestrado em Área de concentração em Fisiopatologia da Reprodução), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

RIBEIRO, L.V.P.; RIGOLON, L.P.; CAVALIERI, F.L.B.; SEKO, M.B.; MARTINEZ, A.C.; RIBEIRO, M.G.; MARTINS, R.R.; ÁVILA, M.R.; DE CONTI, J.B. Recuperação de oócitos e recuperação in vitro de embriões de vacas estimuladas com FSH ou eCG. **Archivos de zootecnia**. v. 60, n. 232, p. 1021-1029, 2011.

ROCHA, J.R.; SANTOS, L.M. As vantagens da sexagen de embriões em bovinos. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, ano IV, n.8, janeiro de 2007.

RUBIN, M.I.B; **Histórico dos 20 anos da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, 2005.

SANTOS, P.H. **Impactos da superestimulação ovariana sobre a diferenciação das células da granulosa bovina**. Dissertação de Mestrado em Farmacologia e Biotecnologia - UNESP. 2017.

SEIDEL, G.E.J.; SEIDEL, S. M. **Training manual for embryo transfer in cattle** 2005.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; ANDRADE, E.R. Aspecto técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: Revisão de Literatura. **Ciências agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 101-110, 2002.

SILVA, D.P.; TOLEDO, H.R.P.; SILVA, R.A.B.; CARVALHO, G.F.; MELO, A.F.; GARCIA, M.S.; et al. Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI): revisão de literatura. **Zootecnia: Pesquisa e práticas contemporâneas - volume 2**, 255-266, 2021.

SPELL, A.R.; BEAL, W.E.; CORAH, L.R.; LAMB, G.C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 287-297, 2001.

SPRÍCIGO, J.F.W.; DODE, M.A.N. **Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI): uma Alternativa para Produção de Embriões Bovinos**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 2016.

VALLE, E.R. **O ciclo estral de bovinos e os métodos de controle**. EMBRAPA, 1991.

VIANA, J.H.M. **Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo**. Comunicado Técnico (EMBRAPA). ISSN 1678-3131, Juiz De Fora-MG, Novembro, 2009.

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

VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.; PALHAO, M.P.; CAMARGO, L.S.A.; Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Anim Reprod**, v.9, p.12-18, 2012.

WÜNSCHE JÚNIOR, A.G et al. Avaliação de uma segunda lavagem uterina sobre a recuperação de embriões em vacas Nelore. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n.3, p. 677-684, jul./set. 2008.