

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA**

DIEGO BORBA MÜLLER

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Área de concentração: Biotécnicas da Reprodução em
Bovinos**

**Uruguaiana
2019**

DIEGO BORBA MÜLLER

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório do Estágio Curricular
Supervisionado em Medicina Veterinária
da Universidade Federal do Pampa,
apresentado como requisito parcial para
obtenção do Título de Bacharel em
Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita

**Uruguaiana
2019**

DIEGO BORBA MÜLLER

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório do Estágio Curricular
Supervisionado em Medicina Veterinária
da Universidade Federal do Pampa,
apresentado como requisito parcial para
obtenção do Título de Bacharel em
Medicina Veterinária.

Relatório defendido e aprovado em 27 de junho de 2019.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita
Orientador
UNIPAMPA

Prof.^a Dr.^a Daniela dos Santos Brum
UNIPAMPA

Prof. M.V. Natan da Cruz de Carvalho
URCAMP

Dedico esta conquista aos meus amados pais, Ari e Cleide, que guiaram meus passos e nunca mediram esforços para este sonho tornar-se realidade. A vocês todo o meu amor e eterna gratidão.

AGRADECIMENTO

A Deus, por iluminar o meu caminho e minhas decisões, concedendo-me força, coragem e sabedoria para que eu chegasse até aqui.

Aos meu pais, Ari e Cleide, e a minha irmã Michele, que me acompanharam em toda a trajetória e nunca mediram os esforços para que este sonho viesse a se tornar uma realidade.

A minha namorada e companheira de todos os momentos Gabriele, que sempre esteve ao meu lado mesmo estando distante, me apoiando em momentos conturbados e comemorando comigo todas as minhas conquistas.

Aos metres responsáveis por todo conhecimento que tive durante a graduação em especial aos meus dois orientadores durante essa trajetória, Dr. Mateus José Sudano e Dr. Fernando Silveira Mesquita, por todos ensinamentos, pela amizade e por sempre me incentivarem a buscar conhecimento.

Aos meus colegas e amigos da XI turma de Medicina Veterinária da Unipampa, por todos os momentos compartilhados juntos sendo eles na sala de aula ou até mesmo no “quiosque”. Nunca deixando de faltar uma boa conversa e um mate.

Aos meus amigos e colegas componentes do Trio Bomba, Felipe e Vinícius pelo companheirismo nesse tempo todo.

Aos colegas do Lab Gen, pelos anos de companheirismo, dedicação e aprendizado que passamos juntos.

Fica meu agradecimento aos amigos da IVB Technology pela amizade e toda a paciência que tiveram ao me auxiliar em todas as atividades exercidas durante o período do estágio. Pessoas fantásticas que pude conviver neste tempo.

Aos meus amigos da república Magoa de Boiadeiro: Pedro, Lino, Leonardo, Reinaldo e Victor, pela amizade e por fazerem eu me sentir em casa, mesmo estando em um estado e cultura diferente. Agradeço também a Bárbara, Luísa e Rafael pelo companheirismo também em momento fora do ambiente de trabalho.

Todos contribuíram de alguma forma para que está trajetória fosse cumprida, obrigado a todos!

“Tudo pela ciência.”

Mateus José Sudano

RESUMO

O presente relatório tem como objetivo descrever as principais atividades desenvolvidas e acompanhadas durante o período do estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV). Sendo realizado com enfoque na área de Biotecnologia da Reprodução Aplicada em Bovinos, onde foi possível acompanhar atividades como aspiração folicular guiada por ultrassonografia, diagnóstico de gestação, produção *in vitro* de embriões, Criopreservação de embriões, inovulação de embriões em receptoras. O local escolhido para realização do estágio foi a ABS Pecplan detentora da tecnologia IVB, oriunda da empresa In Vitro Brasil S/A (IVB), unidade de Uberaba - MG. O ECSMV ocorreu sob a orientação do professor Dr. Fernando Silveira Mesquita e supervisão da Médica Veterinária Luisa Anastácia Santos de Oliveira durante o período de 14 de janeiro a 18 de abril de 2019, perfazendo um total de 536 horas. Desta forma, puderam ser acompanhadas e/ou desenvolvidas as principais biotécnicas aplicadas à reprodução, as quais estão diretamente ligadas ao aumento dos índices produtivos e reprodutivos, bem como ao aumento do ganho genético gerado nos rebanhos.

Palavras-Chave: Melhoramento genético, Produção *in vitro* de embriões, Reprodução Bovina.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Sede da ABS PECPLAN e laboratório de embriões IVB Technology.	16
Figura 2- (A) Aspiração folicular guiada por Ultrassonografia (B) Imagem ultrassonográfica ovariana.....	19
Figura 3- Ficha de Identificação de doadoras e controle da OPU.....	21
Figura 4- Material para sincronização de receptoras e ficha de monitoramento da sincronização e T.E.....	22
Figura 5- Foto de receptoras protocolos na Nelore Lince/MS	23
Figura 6- Ilustração da seqüência de envase, seja freco ou congelamento	24
Figura 7- Laboratório de PIVE da ABS Pecplan na cidade de Uberaba/MG	26
Figura 8- Procedimento de preparo do sêmen e confecção das placas para a FIV: (A): Confecção das placas de FIV. (B): Centrifugação do sêmen	27
Figura 9- Laboratório de Produção de embriões. Incubadoras de Trabalho de FIV, FIV, Trabalho de CIV e CIV.....	29
Figura 10- Identificação dos estádios embrionários: Mórula (A), Mórula compacta (B), Blastocisto inicial (C), Blastocisto (D), Blastocisto expandido (E) e Blastocisto eclodido (F).	30
Figura 11 - Identificação do código de qualidade embrionária: Código 1 (A), Código 2 (B), Código 3 (C), Código 4 (D), Oócitos não fecundados(E).....	32
Figura 12- Placa com os poços do processo de vitrificação.....	33
Figura 13- Processo de seeding e retirada dos embriões da máquina de congelamento.....	34
Figura 14-Volume de embriões produzidos no laboratório de Uberaba – MG, durante o período de Janeiro a Abril de 2019.	35
Figura 15- Volume de embriões produzidos na categoria carne e leite.....	36
Figura 16- Porcentagem de prenhez obtidos pela empresa no ano de 2019, na categoria corte e leite	36
Figura 17- Produção de embriões bovinos de 2000 a 2011	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Atividades acompanhadas junto com equipes da ABS em deslocamento para fazendas de clientes, acompanhamento de 1 de março a 18 de abril de 2019.	17
Tabela 2- Atividades realizadas no laboratório de produção in vitro de embriões na sede da ABS Pecplan em Uberaba, do dia 14 de janeiro a 28 de fevereiro de 2019.	17
Tabela 3- Classificação dos complexos cúmulos-oócitos.	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl – microlitro

ASBIA – Associação Brasileira de Inseminação Artificial

BE – Benzoato de Estradiol

Bi – Blastocisto inicial

BI – Blastocisto

BSA – Albumina Sérica Bovina

Bx – Blastocisto expandido

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

CCO – Complexo *cumulus*-ovócito

CIV – Cultivo *in vitro*

CL – Corpo Lúteo

DT – *Direct Transfer*

ECSMV – Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária

FIV – Fecundação *in vitro*

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

IA – Inseminação Artificial

IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IETS – Sociedade Internacional de Transferência de Embriões

IM – Intramuscular

LH – Hormônio Luteinizante

Mc – Mórula compacta

mg – miligrama

MIV – Maturação *in vitro*

mL – mililitro

mm – milímetro

Mo – Mórula

OPU – *Ovum pick up*

P4 – Progesterona

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PGF2α – Prostaglandina F2α

PHE – Penicilamina, Hipotaurina, Epinefrina

PIVE – Produção *in vitro* de Embriões

RA – Reação Acrossomal

SFB – Soro Fetal Bovino

SOF – Fluido Sintético do Oviduto

TCM – *Tissue Culture Medium*

TE – Transferência de Embriões

ZP – Zona Pelúcida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 ATIVIDADES ACOMPANHADAS E/OU DESENVOLVIDAS	16
2.1 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia	18
2.1.1 Seleção das receptoras e protocolo para sincronização	21
2.1.2 Transferência de embrião.....	23
2.2 Produção <i>in vitro</i> de embriões	25
2.2.1 Maturação <i>in vitro</i>	26
2.2.2 Fecundação <i>in vitro</i>	26
2.2.3 Seleção espermática	28
2.2.4 Cultivo <i>in vitro</i>	29
2.2.5 Vitrificação	33
2.2.6 Congelamento lento (<i>Direct transfer</i>).....	34
2.3 Dados de produção da empresa durante período de estágio	35
3 DISCUSSÃO	37
3.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE)	37
3.2 Maturação <i>in vitro</i>	38
3.3 Fecundação <i>in vitro</i>	40
3.3 Cultivo <i>in vitro</i> e desenvolvimento embrionário	41
3.4 Competência e qualidade embrionária.....	43
3.5 Criopreservação de embriões	45
3.5.1 Vitrificação.....	46
3.5.2 Congelamento Lento	47
4 CONCLUSÃO	49

5 REFERÊNCIAS.....	50
6 ANEXO-A	57

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, com o crescimento da competitividade do mercado externo e a necessidade de uma maior produção de carne, tornou-se indispensável a busca pelo aumento da eficiência produtiva e reprodutiva de bovinos no Brasil, que no ano de 2016 alcançou um rebanho comercial de 214,9 milhões de cabeças (IBGE, 2018). Deste modo, para aumentar a produção de carne e leite, biotécnicas aplicadas à reprodução cada vez mais ganham espaço visando à multiplicação de animais com grande potencial genético e zootécnico diminuindo o intervalo de tempo entre as gerações e ajudando na contribuição de programas de melhoramento genético.

Como uma das primeiras ferramentas para o melhoramento genético o uso da inseminação artificial (IA) teve seu primeiro registro em 1912, pelo Médico Veterinário Epaminondas Alves de Souza, cujos principais avanços datam da década de 1930 (SEVERO, 2015). Através da exploração científica a IA, suas aplicações e derivações têm sido constantemente aperfeiçoadas, atingindo avanços significativos como aqueles alcançados pela inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Nos anos recentes o uso da IATF tem ganhado significativo espaço; Entretanto, o Brasil ainda apresenta índices de apenas aproximadamente 10% do seu rebanho expostos à IA (ASBIA, 2017).

Dentre as biotécnicas que visam encurtar o intervalo entre gerações e acelerar o melhoramento genético, temos a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE), as quais tornaram o Brasil um destaque no cenário mundial, atingindo 30% da produção mundial com 375.000 embriões no ano de 2015 (IETS, 2016).

Deste modo, o Brasil possui uma importância muito grande no cenário da PIVE, estando presente no país uma das maiores empresas de biotecnologias do mundo, a ABS Pecplan. A empresa destaca-se no cenário atual devido ser detentora da tecnologia de uma das maiores empresas produtora de embriões, a IN VITRO BRASIL (IVB Technology).

Atualmente possui nove laboratórios localizados no Brasil, Estados Unidos, Rússia, Colômbia, México e Moçambique. A sua matriz está localizada em Uberaba – MG/Brasil. Além da matriz a empresa possui diversas franquias presentes em diversos países, onde são comercializados meio de cultura e protocolos de produção *in vitro* de embriões.

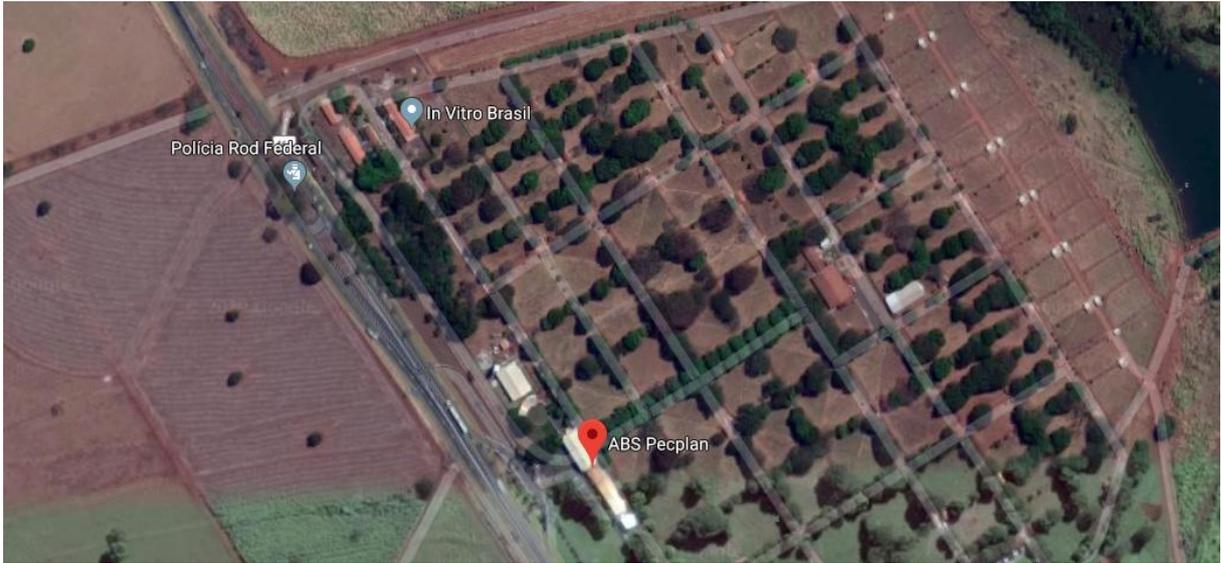
A IN VITRO BRASIL S/A foi criada em 2002 com o propósito de atender a demanda crescente da PIVE em bovinos no Brasil. Atualmente possui três laboratórios no Brasil: Uberaba – MG (matriz), Mogi Mirim – SP e Xiguará – PA, totalizando pelo mundo 37 laboratórios. O destaque da empresa no cenário nacional de um país relevante no cenário mundial da PIVE atraiu o interesse do Grupo Genus PLC, dono da multinacional ABS Pecplan, que em 2015 comprou 51% da IVB, tornando-se sócio majoritário.

Em 2018 o grupo Genus comprou os 49% restantes da empresa. A ABS dentro setor de prestação de serviços de produção de embriões PIVE trabalha fornecendo aos seus clientes os serviços de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU), PIVE, transferência de embriões (TE), *direct transfer* (DT), vitrificação, desvitrificação, diagnóstico de gestação, sexagem e clonagem.

Devido às atividades desenvolvidas com grande expressão dentro do mercado das biotecnologias da reprodução, o grande número de embriões produzidos ao longo dos anos e o interesse pessoal do acadêmico pela área, a ABS Pecplan, mais especificamente o laboratório de PIVE IVB Technology, localizado dentro da central da ABS Pecplan (Figura 1), foi o local escolhido para a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV).

Deste modo, o presente relatório tem como objetivo descrever as atividades acompanhadas durante o ECSMV, com destaque à produção *in vitro* de embriões e os métodos de congelamento do embrião.

Figura 1 - Sede da ABS PECPLAN e laboratório de embriões IVB Technology.



Fonte: Google Maps.

2 ATIVIDADES ACOMPANHADAS E/OU DESENVOLVIDAS

Durante a realização do ECSMV foi possível dividir o período de permanência entre os dois momentos distintos: atividades de campo junto com as equipes que visitavam as fazendas, e atividades laboratoriais que consistiam no recebimento dos oócitos vindos do campo, seguido por rotinas de maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV), cultivo *in vitro* (CIV). A partir dos embriões produzidos, as possíveis aplicações consistiam em: transferência a fresco, congelamento lento, vitrificação e posteriormente aquecimento e inovulação, de acordo com a demanda das propriedades.

As atividades que foram realizadas durante o estágio foram dispostas nas tabelas 1 e 2. Sendo dispostas na tabela 1 atividades acompanhadas ou realizadas a campo e na tabela 2 atividades realizadas ou acompanhadas referentes ao laboratório, seguindo a ordem cronológica da PIVE.

Tabela 1 - Atividades acompanhadas junto com equipes da ABS em deslocamento para fazendas de clientes, acompanhamento de 1 de março a 18 de abril de 2019.

Atividades acompanhadas	Número de atividades	Nº de animais	%
Aspiração folicular guiada por ultrassonografia	6	89	19,35%
Sincronização da ovulação em bovinos (*)	8	791	25,80%
Transferência de embrião	4	289	12,90%
Diagnóstico de gestação (*)	6	379	19,35%
Sexagem fetal (*)	7	554	22,58%
Total	31	1609	100%

Fonte: O autor

As atividades que puderam ser realizadas durante o período do estágio estão identificadas com (*), devido a complexidade muitas atividades foram so acompanhadas.

Tabela 2 - Atividades realizadas no laboratório de produção in vitro de embriões na sede da ABS Pecplan em Uberaba, do dia 14 de janeiro a 28 de fevereiro de 2019.

Atividades	Nº de atividades realizada	Nº oócitos/ embriões	%
Maturação <i>in vitro</i>	5	1631	11,90%
Fecundação <i>in vitro</i>	9	8712	21,42%
Cultivo <i>in vitro</i>	14	11234	33,33%
Vitrificação	6	462	14,28%
<i>Direct Transfer</i>	7	1182	16,66%
Envase a fresco	1	22	2,3%
Total	42	23521	100%

Fonte: O autor.

Dentro das atividades descritas acima, optou-se por fazer a descrição das atividades realizadas de campo e laboratório, mas apenas a discussão das atividades laboratoriais.

2.1 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia

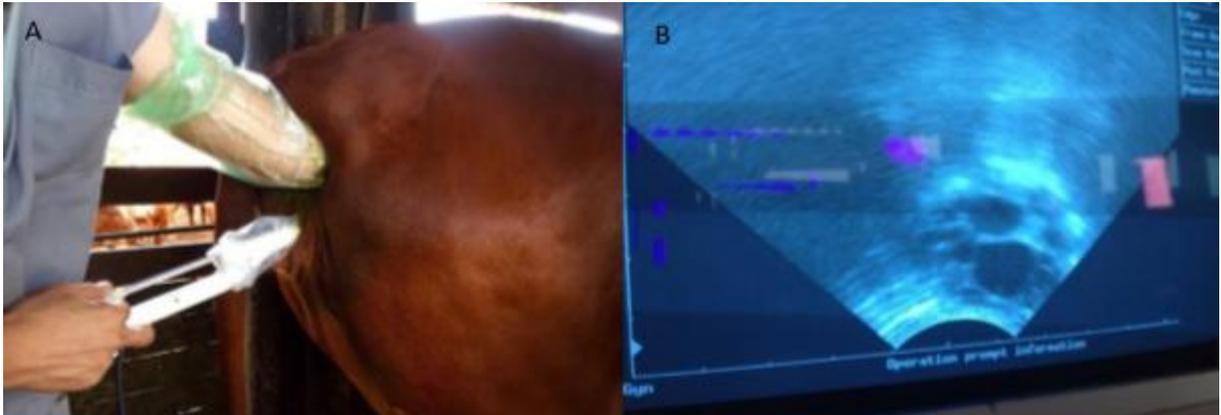
Visando o aumento do ganho genético e disseminação de genética superior a aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU) tem sido muito difundida dentro da pecuária brasileira. A técnica consiste na aspiração folicular dos dois ovários da doadora para obtenção dos oócitos, seguida por seleção dos oócitos recuperados. Com o animal devidamente contido eram obtidos os oócitos e levados para o laboratório preparado dentro da fazenda, onde eram selecionados os oócitos e encaminhados em criotubos para o laboratório.

Previamente à obtenção dos oócitos era realizada a tricotomia e antissepsia da região sacrococcígea com álcool 70%, seguida de aplicação de anestesia epidural com lidocaína 2% (BLOC – J.A Saúde Animal), aplicada no espaço intervertebral S5-C1. A dose utilizada era de 1mL a cada 100Kg de peso vivo, em função da raça e escore de condição corporal (ECC). Posteriormente era realizada a limpeza da vulva com água e álcool 70%, introdução da guia de aspiração, seguida por limpeza do reto para assim dar início ao procedimento.

O técnico introduzia pela vagina da doadora a guia de aspiração que, juntamente com o mandril, era posicionada no fundo do saco vaginal (Figura 2A). A guia de aspiração era composta por base de acrílico para possibilitar o controle e posicionamento do transdutor micro-convexo. Esta base apresenta na parte superior o mandril com um cateter (18G 1,2mm). Para aspiração era usado um sistema fechado, pelo qual a pressão negativa do sistema de mangueiras ligada ao mandril gera um fluxo de sucção direcionado a um tubo cônico de 50mL para a obtenção dos oócitos. Os tubos de coleta de oócitos continham solução de PBS com 400µL de heparina. A solução era mantida a 36°C.

Com a mão posicionada pelo reto da doadora o técnico direcionava o ovário até o transdutor possibilitando a visualização dos folículos e mapeamento do ovário para começar a aspiração (Figura 2B). A bomba do sistema de vácuo era acionada iniciando o processo de aspiração. Eram aspirados todos os folículos visíveis no ovário, sendo o líquido folicular guiado para o tubo cônico.

Figura 2 - Procedimento de aspiração folicular guiada por ultrassonografia. (A) Aspiração para obtenção dos oócitos (B) Imagem ultrassonográfica ovariana.



Fonte: O autor.

Ao término da aspiração o técnico removia da vagina da doadora, o mandril de dentro da guia, e o cateter. Um tubo com solução de lavagem era usado para a limpeza do sistema de aspiração. Era realizada a aspiração, com pressão aumentada, da solução limpeza, evitando que coágulos ou estruturas ficassem retidos no sistema de vácuo. Posteriormente, era substituída-se a camisinha de proteção e introduzia-se novo cateter, visando minimizar os riscos de contaminação entre doadoras. Também era introduzido ao sistema um novo tubo de 50 mL para a coleta da próxima doadora.

Após, os tubos de coleta contendo oócitos eram fechados e identificados com o registo genealógico definitivo (RGD) da doadora, raça, categoria e status reprodutivo e produtivo. Assim eram encaminhados para o técnico selecionador com cuidado evitando agitações e protegendo de luz solar.

Para realizar a seleção dos oócitos era preparado um laboratório em um local fechado, sem presença de correntes de ar, evitando a exposição à luz solar e, preferencialmente, próximo ao curral onde está ocorrendo a aspiração das vacas. O conteúdo do tubo era despejado em um filtro para a separação do líquido celular, coágulos, sujidades e complexos cumulus-oócitos (CCO). Com solução Tampão Fosfato Salino Modificado por Dulbecco (DMPBS) aquecida era feita a lavagem do filtro e depositado em uma placa de Petri para o rastreamento dos oócitos sob estereomicroscópio. Com o auxílio de um micropipetador, os oócitos eram rastreados, separados, classificados e lavados na seguinte sequência: uma gota

com meio lavagem (LAV) + 200 µL de meio LAV e 200 µL de meio MIV + uma gota de meio MIV.

O técnico era responsável por selecionar os oócitos viáveis e classificar conforme sua qualidade em: Grau I, Grau II, Grau III e oócitos desnudos e com citoplasma irregular. Através dessa classificação (Tabela 3) eram avaliados os aspectos estruturais e morfológicos dos CCO.

Tabela 3 - Classificação dos complexos cúmulo-oócitos.

Grau de qualidade	Características dos complexos <i>cumulus</i> -oócitos
1	Ovócito com citoplasma homogêneo e múltiplas e compactas camadas de células do <i>cumulus</i> .
2	Citoplasma com poucas áreas heterogêneas e mais do que cinco camadas de células do <i>cumulus</i> completas.
3	Citoplasma heterogêneo ou com vacúolos, três a cinco camadas de células do <i>cumulus</i> e/ou pequenas áreas desnudas.
4	Citoplasma heterogêneo, células do <i>cumulus</i> ausentes ou expandidas.

Fonte: Adaptado de Stojkovic et al. (2001).

Após a classificação e identificação na ficha de OPU (Figura 3) os oócitos eram acondicionados em criotubos contendo 400 µL de meio MIV e 300 µL de óleo mineral com a presença de 5% de CO₂. A transportadora de oócitos era mantida em 36°C durante o transporte dos criotubos até o laboratório de PIVE. A maturação *in vitro* (MIV) já era iniciada durante este período de transporte.

Juntamente com a transportadora era enviada a ficha de aspiração, a qual continha as informações da doadora, grau de qualidade dos oócitos, oócitos viáveis, oócitos degenerados, quantidade total de oócitos, horário do término da seleção dos oócitos obtidos daquela vaca e o acasalamento: Doadora x touro (Figura 3). Geralmente no mesmo dia, as palhetas de sêmen do touro escolhido para a FIV eram separadas e transportadas ao laboratório de PIVE.

Figura 3 - Ficha de Identificação de doadoras e controle da OPU.

ABS www.abspecplan.com.br Mogi Mirim-SP: (19) 99937 7457
Uberaba-MG: (34) 3318 2834
Xinguaçu-PA: (34) 35112 3836

CERTIFICADO DE COLETA DE OÓCITOS

Endereço:				Proprietário:										Nº Coleta		
Veterinário:				Seleção:						Data da Coleta de Oócitos:						
Nº	Touro	Raça	Doadora	RGD	Raça	Categ	P+/VZ	Obs	GI	GII	GIII	Viáveis	Desn	CI	Total	Hora
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																
11																
12																
13																
14																
15																
16																
17																
18																
19																
20																

Doses Enviadas ao Lab		Email:		Receptoras:		Destinados à Maturação	
Qtidade	Touro	Telefone:		Vitriificar		Total Viáveis	
		Late PBS:		DT		Destinados ao Congelamento	
		Late Heparina:				0	
		Equipamento:		Obs:			
		Temp da termometro na chegada:					
Responsável (Fazenda): _____							
Carimbo e Ass do MV Resp pela Coleta: _____							

Fonte: O autor.

2.1.1 Seleção das receptoras e protocolo para sincronização

Um desafio para o sucesso na PIVE é a seleção de receptoras, pois essas levarão a termo a gestação. Para a escolha das fêmeas deve ser realizada uma avaliação através de histórico das mesmas e exame ginecológico completo. Deste modo, apenas fêmeas aptas à reprodução entrarão para o protocolo de sincronização da ovulação.

A empresa seguia alguns critérios pré-estabelecidos pela equipe para realizar a seleção das receptoras. Para participar do protocolo os animais deviam estar imunizados com vacinas contra enfermidades com potencial impacto reprodutivo, estar com escore de condição corporal (ECC) dentro do aceitável (2,75 a 3,75), considerando a escala de 1 a 5, onde 1 indica animal muito magro e 5 animal obeso.

O material de sincronização era organizado no curral onde seria realizado o trabalho (Figura 4), assim como o ultrassom para a avaliação complementar por imagem ultrassonográfica. O exame ginecológico era realizado através da palpação transretal, onde o veterinário avaliava a cérvix, comprimento e tônus uterino, tamanho dos ovários e atividade ovariana, com avaliação da presença de folículos em desenvolvimento e a presença ou não de corpo lúteo. Após era realizado o exame de ultrassonografia visando à avaliação do útero e ovários, pela identificação

de corpo lúteo (CL), folículo dominante (FD) e presença alterações patológicas. Através do processo de seleção realizado com base no exame era possível ter um maior número de receptoras respondendo ao protocolo.

Figura 4 - Material para sincronização de receptoras e ficha de monitoramento da sincronização e T.E.



Fonte: O Autor.

Ao término do serviço os veterinários repassavam ao responsável pela propriedade os dias de manejos da sequência do protocolo e os hormônios a serem comprados e aplicados. Além da orientação de manter os animais com suprimento nutricional adequado (Figura 5), sugeria-se evitar o estresse dos animais nos manejos subsequentes. A empresa, na maioria das vezes, prestava o serviço de avaliação e sincronização das receptoras no dia 0 (D0) e no dia da TE (D17).

O protocolo da empresa era implementado da seguinte forma: No D0, as receptoras recebiam o implante intravaginal de progesterona (P4) e 2mL de benzoato de estradiol (BE) intramuscular (IM). No dia 8 (D8) era retirado o implante de P4 e era administrado 2mL de cloprostenol IM para induzir a luteólise do CL. Neste momento aplicado era também 0,5mL de cipionato de estradiol (CE) IM para a indução da ovulação, e era realizada a administração de 1,5 a 2mL de gonadotrofina coriônica equina (eCG) IM. Para realizar a inovulação do embrião na receptora era feita uma avaliação da presença e dimensões do CL. A T.E. era realizada no D17 nas receptoras que haviam respondido ao protocolo, de acordo com a avaliação da presença de CL. Através do tamanho do CL era possível estimar a resposta desta

fêmea ao protocolo. Sendo usada uma escala de 1 a 3 (1- resposta fraca, 2 - resposta normal e 3 - ótima) para definir a utilização da receptora e realização da T.E.

Os animais com resposta ovariana fraca ou sem resposta eram descartados da T.E. Ao final do serviço, calculava-se a taxa de aproveitamento das receptoras, visando estimar a quantidade de receptoras necessárias para uma determinada quantidade de embriões em serviços futuros dentro da propriedade. A taxa média geral de aproveitamento da empresa era entorno de 80% de resposta das receptoras.

Figura 5 - Foto de receptoras protocolos na Nelore Lince/MS.



Fonte: O Autor.

2.1.2 Transferência de embrião

A etapa de transferência dos embriões PIV consiste na inovulação no corno uterino ipsilateral à ovulação. Os embriões, na grande maioria das vezes, saem envasados do laboratório e são transportados em transportadoras de embriões em temperatura adequada até a propriedade. Junto à transportadora é enviada a ficha de transferência de embriões, onde estão presentes informações de: estágio embrionário, qualidade embrionária, acasalamento utilizado e nº da receptora.

Quando a propriedade do cliente é muito distante do laboratório a logística realizada consiste em levar embriões em D6, acondicionados em tubos com 400µL de HSOE em transportadora de oócitos.

No D7, seja na fazenda onde foi montado o laboratório móvel, ou no laboratório em Uberaba, os embriões eram envasados por um técnico d laboratório

através do auxílio de um estereomicroscópio. O técnico aspirava com uma palheta transparente de 0,5mL meio HSOF, ar, meio com embrião, ar, meio, ar e meio conforme a Figura 6.

Figura 6 - Ilustração da sequencia de envase, seja fresco ou congelamento lento.



Fonte: O autor.

Após o envase e identificação devida, os embriões eram acomodados na transportadora de embrião a 36°C para serem levados para o curral. No curral o Médico Veterinário avaliava as receptoras sincronizadas através da palpação transretal, classificando-as em aptas ou não para receber o embrião, conforme descrito acima.

O CL era classificado pelo avaliador em graus de 1 a 3 conforme seu tamanho: 1- CL com uma leve proeminência à palpação e uma massa inferior ou compatível a um terço do ovário pela imagem ultrassonográfica, 2- CL com uma leve proeminente pela palpação transretal e com uma massa ocupando 50% do ovário, 3- CL bem proeminente a palpação formando uma massa acima de 50% do tamanho do ovário através da imagem ultrassonográfica. Assim, levando em consideração que quanto maior seja o CL maior é sua capacidade de produção de progesterona, bem como o papel relevante da P4 na manutenção da gestação, considera-se que a chance de vacas com uma melhor resposta ovariana tornarem-se gestantes é maior.

Em receptoras com uma boa resposta ovariana era realizada a TE da seguinte forma: tricotomia na região sacrococcígea, anti-sepsia com álcool 70% e anestesia epidural. Após a confirmação de que a receptora estava apta, era montado o inovulador, depositando o embrião dentro da bainha com a presença de uma camisinha sanitária. Posteriormente, era encaixado o inovulador dentro da bainha. O inovulador era introduzido via transvaginal e a mão oposta introduzida no reto da receptora para localizar e transpassar a cérvix. Após transpassar o primeiro anel cervical a camisinha sanitária era rompida, evitando a contaminação do útero por conteúdo vaginal. Ao atingir o corpo do útero o inovulador era direcionado para o

corno uterino ipsolateral à ovulação onde houve a formação do CL, assim depositava o embrião o mais cranial possível dentro do corno uterino.

Todas as informações relacionadas ao embrião e às receptoras eram anotadas na ficha de TE pelo auxiliar, Ao término do serviço o Médico Veterinário orientava o proprietário ou responsável no local no dia para que evitasse manejos com o lote de fêmeas transferidas, fornecesse pasto de qualidade, e minimizasse o estresse para os animais.

2.2 Produção *in vitro* de embriões

O processo de produção *in vitro* de embriões tem como característica avançar o melhoramento genético e encurtar o intervalo entre gerações. Neste contexto, o avanço do melhoramento genético consiste em coletar oócitos de doadoras de mérito genético superior, realizar a fecundação em laboratório com touros de alto mérito genético e transferir para fêmeas com boa habilidade materna, ou realizar o congelamento para posterior transferência. A técnica de produção *in vitro* de embriões consiste em três etapas: Maturação *in vitro* (MIV), Fecundação *in vitro* (FIV), Cultivo *in vitro* (CIV).

A produção acontece no laboratório da empresa (Figura 7) situado na cidade de Uberaba onde foram acompanhadas as etapas descritas acima.

Possuindo uma infra-estrutura ampla e moderna, o laboratório de PIVE tem cerca de 6 meses, desde sua inauguração do laboratório junto a sede da central da ABS Pecplan. Junto ao prédio está o laboratório comercial, laboratório de desenvolvimento de pesquisa, laboratório de treino, sala de envase e de embriões *Direct Transfer* (DT), estoque e armazenamento de sêmen e embriões, sala de esterilização, sala de campo e escritório.

Toda infra-estrutura dentro do laboratório comercial possibilita que 6 técnicos trabalhem ao mesmo tempo nos seis fluxos disponíveis no seu interior ao centro da sala. Nas bancas laterais estão dispostas a incubadoras para FIV e CIV. Tendo cinco de cada lado da sala totalizando dez incubadoras, onde, eram dispostas uma Trabalho de FIV de cada lado da sala colocando os meios para aquecer e uma incubadora de FIV, onde eram colocados as estruturas para o processo de fecundação. Possuindo ainda três incubadoras de CIV, uma trabalho de CIV e duas de cultivo.

Figura 7 - Laboratório de PIVE da ABS Pecplan na cidade de Uberaba/MG.



Fonte: O autor.

2.2.1 Maturação *in vitro*

O processo de maturação *in vitro* (MIV) acontece a partir do momento em que o oócito é selecionado e colocado em contato com o meio MIV (MIV mais adição de FSH e LH), os oócitos são dispostos em criotubos com no máximo 70 oócitos. O processo deve durar de 22-24 horas, e normalmente se dá em transportadoras de oócitos (TO) com a presença de CO₂ no seu interior e vedação com rolhas. Na chegada ao laboratório as rolhas são removidas dos tubos, e é feita a identificação das raques de isopor com o nome do cliente, as quais são colocadas dentro da incubadora de MIV.

2.2.2 Fecundação *in vitro*

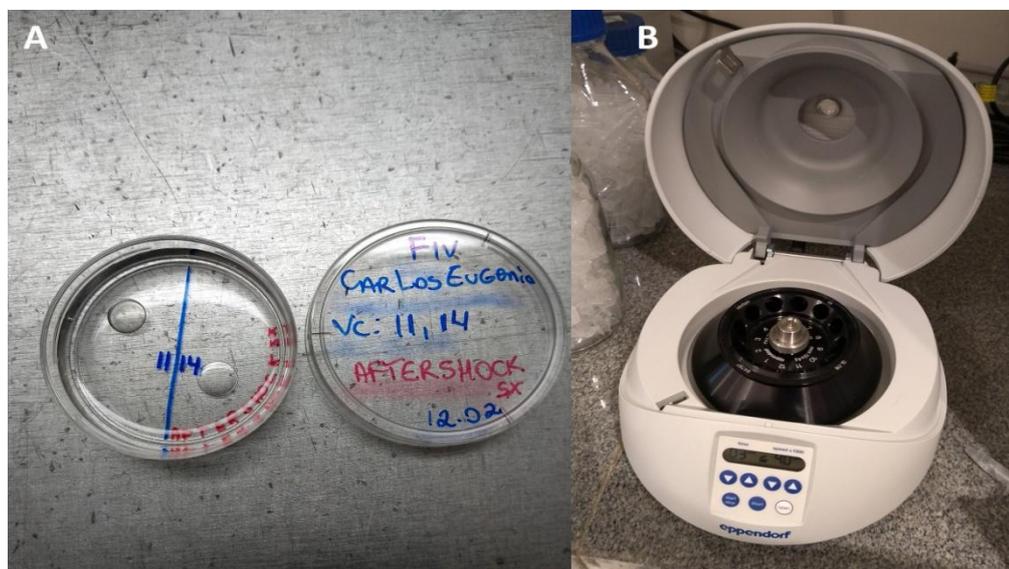
O processo de fecundação *in vitro* (FIV), que dura em torno de 18 horas, consiste no ato expor os oócitos ao sêmen devidamente capacitado, após o processo de MIV.

Inicia-se o processo de FIV com a recepção dos oócitos durante a MIV. As informações da ficha de campo eram passadas aos laboratoristas, o qual identifica a quantidade de oócitos por doadora, quantidade de doadoras e acasalamentos

realizados. Ainda é calculada a quantidade de meio necessária para o preparo das placas de FIV e preparo do sêmen. O preparo do meio FIV GOTAS é feito a partir da quantidade de oócitos. Deste ponto em diante o meio é aliquotado e suplementado. A suplementação é feita antes de cada uso com 11 μ L de heparina, 44 μ L de HE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina) e 5 μ L de Antibiótico (DMSO) pra cada mL. O meio deve ficar no mínimo 1 hora e meia estabilizando dentro da incubadora antes que possa receber os oócitos. Antes de montar as gotas nas plaquinhas elas são devidamente identificadas com o procedimento, data do procedimento, número de gotas e touro que será utilizado conforme mostra a Figura 3A.

Posteriormente os oócitos são lavados em 2 gotas de meio FIV GOTAS para retirar a presença do meio MIV e sujidades, evitando alterações nas características do meio FIV. No meio FIV os oócitos são dispostos em gotas de 50 μ L sendo sêmen convencional e 25 μ L na utilização de sêmen sexado de meio FIV GOTAS, cada gota com no máximo 30 oóctios. O processamento do sêmen varia conforme a tipo de sêmen.

Figura 8 - Procedimento de preparo do sêmen e confecção das placas para a FIV: (A): Confecção das placas de FIV. (B): Centrifugação do sêmen.



Fonte: O autor.

2.2.3 Seleção espermática

O sêmen para ser utilizado dentro da FIV precisa passar por um processo de seleção espermática, deste modo possibilitando a utilização apenas de espermatozoides viáveis. Deste modo, cada empresa possui seu protocolo para o preparo do sêmen. A IVB possui os seguintes protocolos: Protocolo sêmen sexado e Protocolo de sêmen convencional.

Na realização da seleção espermática de sêmen sexado é depositado 400 μ L de Percoll 90% e com cuidado é depositado o Percoll 45% no fundo do tubo, após formado o gradiente, coloca-se o tubo na incubadora para o aquecimento. Com o gradiente pronto era descongelada a dose do sêmen de 0,25mL na temperatura de 37°C por 30 segundos e adicionava-se o sêmen no tubo de eppendorf sob gradiente.

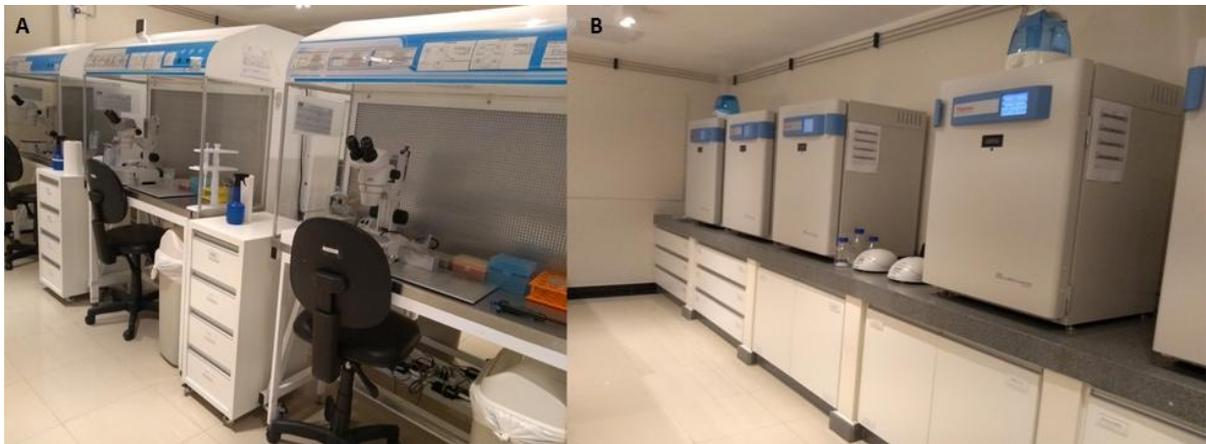
Após colocar o sêmen dentro do tubo, o mesmo é levado para a uma centrífuga a 10.000 RPM por 5 min (Figura 8B). Ao término da primeira centrifugação é realizada a segunda com o com a adição de 1mL de meio FIV no pellet formando, realiza-se assim a segunda centrifugação a 4.000 RPM por 3 minutos. Após a segunda centrifugação acrescentava-se 90 μ L de meio ao pellet formado, assim obtinha-se o volume usado para a fecundação. Era utilizada uma dose padrão para sêmen sexado de 10 μ L a 15 μ L. Não era realizada a concentração espermática, apenas análise subjetiva da motilidade e vigor do sêmen pós-seleção espermática.

Quanto ao preparo para o sêmen convencional, utilizava-se 400 μ L de Percoll 90% e montava-se o gradiente com Percoll 45% ao fundo. Após o aquecimento dos tubos destinados a receber as doses de sêmen e os que continham o gradiente de Percoll, ligava-se para o estoque de sêmen e pedia que fosse realizado o descongelamento das palhetas. O responsável descongelava as palhetas solicitadas a 37°C por 30 segundos e as encaminhava ao laboratório, onde o laboratorista conferia a partida do sêmen e depositava o sêmen sobre o gradiente no tubo. O sêmen era centrifugado a 9.000 RPM por 5 minutos. Logo após era retirado o sobrenadante deixando apenas o pellet de espermatozoides, adicionava-se 1mL do meio Fiv Touros junto ao pellet. Realizava-se a segunda centrifugação com 1.000 RPM por 3 minutos. Era realizada a pipetagem de 90 μ L de meio FIV-GOTAS, assim ficando pronto para fecundação. Não era realizado a concentração espermática

sendo usado de 3 a 10ul para a fecundação, sendo usado apenas a avaliação do laboratorista quanto a motilidade e vigor e a concentração visual da gota.

Após a fecundação de todos os oócitos previstos para processamento naquele turno, eram encaminhadas todas as placas da incubadora de FIV trabalho para a incubadora de FIV (Figura 9). As placas eram mantidas na incubadora por 24 horas, sobre a temperatura de 37°C e atmosfera de 5%CO₂ e umidade saturada.

Figura 9 - Laboratório de Produção de embriões:(A) Capela de fluxos para realização de procedimentos, (B) Incubadoras de Trabalho de FIV, FIV, Trabalho de CIV e CIV.



Fonte: O autor

2.2.4 Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* (CIV) é a etapa onde acontece o desenvolvimento do embrião dentro dos processos realizados. É o mais longo, durando cerca de 7 dias até o desenvolvimento do embrião para o estágio de blastocisto expandido, sendo deste modo transferível.

O preparo do meio de cultivo deve ser realizado no mínimo com uma hora de antecedência devido à necessidade da estabilização de temperatura e atmosférica. Após é realizado o desnudamento dos oócitos fecundados, através de repetidas pipetagens em meio TL sêmen. O processo é feito em uma gota de 100µL de TL sêmen, uma gota com 50µL de TL sêmen e 50µL de meio C4 e uma gota de 100µL de C4. Este processo tem como função retirar as células do cúmulo que cumpriram sua função de maturação do oócito durante a MIV. Após ser desnudado e lavado em uma gota de C4 as estruturas são acondicionadas em placas que ficarão durante

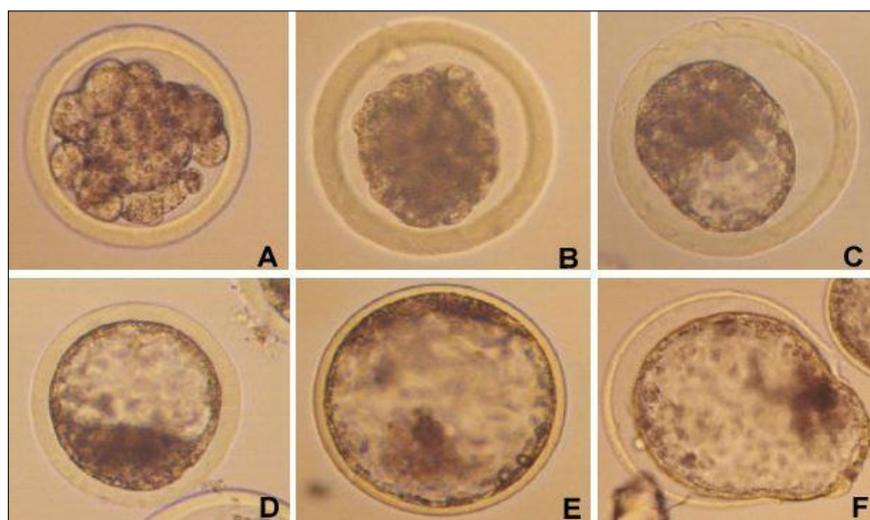
mais 6 dias na incubadora. É feito o controle da temperatura de 39°C e atmosfera de 5% CO₂, 5% O₂ e 90% de N₂.

O meio utilizado na CIV é o C4 meio comercial da empresa, onde os embriões ficam do dia 1, início do cultivo, até o D4 onde acontece o feeding, onde adiciona-se meio novo nas gotas de cultivo, aumentando o substrato para os embriões. Após era verificação da taxa de clivagem dos embriões e a adição do meio C5, deste modo ficando 50% meio C4 e 50% meio C5.

No D6 é realizada a previsão dos embriões que serão envasados, vitrificados e ou congelados pelo método DT. A previsão é feita pela contagem das mórulas presentes em cada gota, desta forma a equipe de campo fica preparada para o provável número de transferências, e no laboratório a equipe que realizará a vitrificação prepara os meios para realização da técnica. Na técnica de DT os lacres das palhetas e raques são preparados com a previsão que serão utilizados no dia seguinte, devido a grande rotina que é realizada no D7.

No dia 7 do cultivo dos embriões era realizado o envase, tendo prioridade embriões com estágio blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX) e blastocistos em eclosão (BE)(Figura 10). Blastocistos em eclosão são destinados a TE em situações onde o cliente está próximo ao laboratório devido a aderência do embrião a palheta com o passar do tempo.

Figura 102 - Identificação dos estádios embrionários: Mórula (A), Mórula compacta (B), Blastocisto inicial (C), Blastocisto (D), Blastocisto expandido (E) e Blastocisto eclodido (F).



Fonte: Adaptado de VIANA, 2009.

Para realizar a classificação dos embriões era seguida as normas estabelecidas pela IETS (2015). A avaliação era feita pelo técnico laboratorista com auxílio de um estereoscópio, levando em consideração a formação da blastocele, a presença de células extrusas do embrião, formação do botão embrionário e formato do embrião conforme ilustra a Figura 10 e a tabela 4.

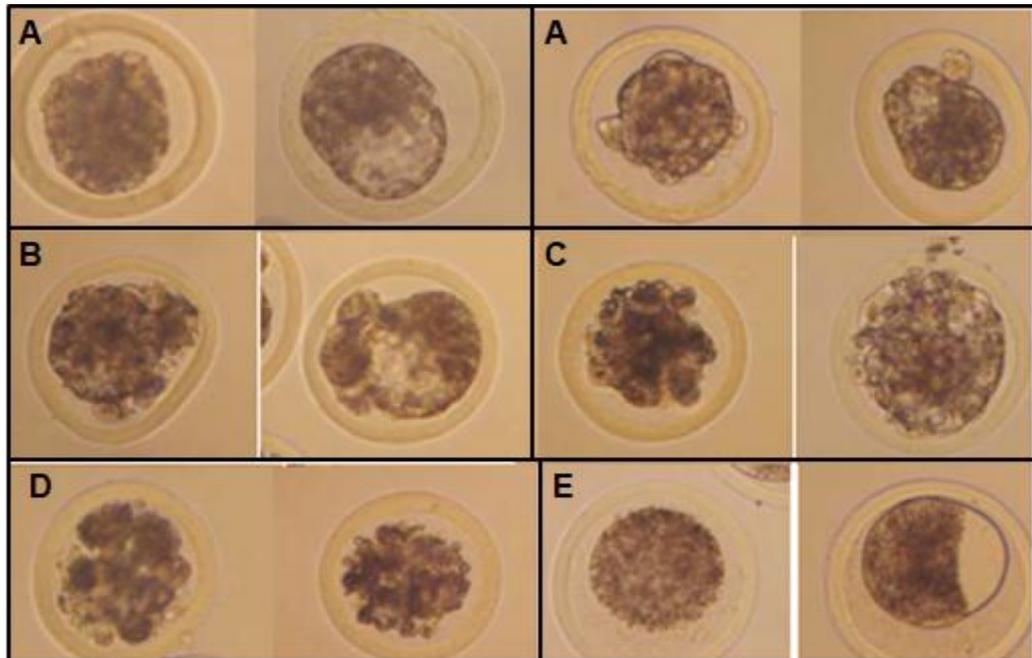
Quadro 1 - Classificação dos estádios embrionários e descrição da morfologia para avaliação da qualidade.

Estádio Embrionário	Descrição da qualidade morfológica
Mórula (Mo)	Evidência dos blastômeros, porém não sendo possível definir a quantidade exata deles. As células ocupam a maior parte do interior da zona pelúcida.
Mórula compacta (Mc)	Compactação torna a massa de células coesa, dificultando a individualização dos blastômeros, e causa retração do embrião em relação à zona pelúcida, com aumento do espaço perivitelínico. Formação de junções de adesão, assim havendo a diferenciação celular e formação da blastocele.
Blastocisto inicial (Bi)	Os blastômeros através de gradientes de osmose atraem água para o espaço intercelular, formando deste modo a blastocele. As células se diferenciam em células da massa celular interna (MCI) e trofotoderma lateralmente ao zona pelúcida.
Blastocisto (B)	O aumento da blastocele torna-se proporcional e maior que a massa celular interna (MCI) e ocupando gradualmente todo o espaço perivitelínico.
Blastocisto expandido (Bx)	Conforme a progresso dos dias a blastocele do embrião aumenta de tamanho e reduz a espessura da zona pelúcida (ZP). Maior desenvolvimento do trofoblasto, a MCI é visível dependendo da posição do embrião.
Blastocisto eclodido (Be)	Rompimento da ZP caracteriza a eclosão, embrião entra em contato direto com os tecidos maternos.

Fonte: Adaptado de VIANA (2009).

Para diminuir a variação da classificação da qualidade embrionária a IETS criou um padronização em quatro classificações, seguindo assim os seguintes critérios de avaliação, conforme mostra a figura 11:

Figura 31 - Identificação do código de qualidade embrionária: Código 1 (A), Código 2 (B), Código 3 (C), Código 4 (D), Oócitos não fecundados(E).



Fonte: O autor.

Código 1: Excelente ou bom. Embriões sem defeitos morfológicos, apresentando massa embrionária simétrica e esférica, com tamanho uniforme, cor e densidade normais. Este embrião é consistente com seu estágio esperado de desenvolvimento. Ausência ou presença de poucas células extrusas, tendo cerca de 85% do material celular derivado de massa embrionária viável intacta. Com o máximo de potencial para transferência a fresco ou congelamento. Embriões indicados para comércio internacional.

Código 2: Regular. Embrião com maior quantidade de alterações morfológicas ou extrusões celulares, mas com 50% ou mais da massa celular íntegra e mostrando sinais de desenvolvimento.

Código 3: Pobre. Presença de irregularidade moderada no embrião. Tendo extrusão e fragmentação de mais de 50% da massa celular. Assim comprometendo o potencial desenvolvimento embrionário.

Código 4: Morto ou degenerado. Embriões com massa celular comprometida, com blastômeros de vários tamanhos mostrando células degeneradas em fase de picnose, coloração alterada e fragmentação.

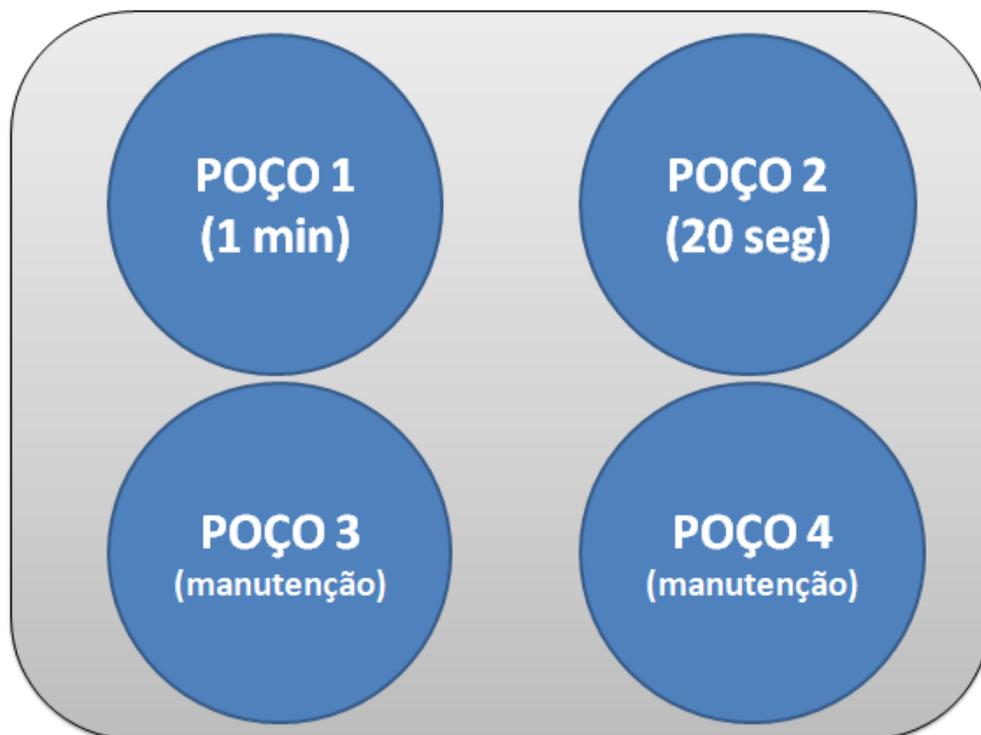
2.2.5 Vitrificação

Os embriões são destinados para criopreservação através da técnica de vitrificação devido a escolha do cliente no momento de finalizar seu contrato com a empresa. É muito utilizada em locais onde a logística não permite levar os embriões a fresco devido a distância da fazenda em relação ao laboratório.

As classificações dos embriões são feitas conforme o estágio embrionário (Quadro 1) e o código de qualidade da IETS citados acima. Sendo priorizados embriões em estágio de blastocisto e blastocisto expandido e Grau I de qualidade.

Os embriões são selecionados e colocados em meio de manutenção nos poços 3 e 4 (Figura 12), onde o mesmo poderia permanecer por alguns minutos sem haver prejuízos morfológicos e estruturais. O processo inicia quando os embriões são pipetados no poço 1, permanecendo no meio s1m por 1 minuto (FIGURA 12). Com o fim do 1 minuto os embriões são pipetados em uma gota de 10 μ L do meio s2m do poço 2, por 20 segundos (Figura 12). Ao final do processo os mesmos são mergulhados em nitrogênio líquido.

Figura 42 - Placa com os poços do processo de vitrificação.



Fonte: O autor.

2.2.6 Congelamento lento (*Direct transfer*)

Conforme no processo de vitrificação, os embriões são destinados devido escolha do cliente, a partir disso, os embriões são escolhidos ficam na primeira gota com HSOF. São congelados apenas embriões no estágio de blastocisto expandido (Figura 10) com o código de qualidade 1 (Figura 11). A partir do momento que estão separado embriões de 5 vacas começa o protocolo, solta os embriões na primeira gota com metade de meio T2 e metade do meio de HSOF, com múltiplas pipetagens e visualização do técnico espera o embrião regredir, deixando nesta gota entorno de 1 minuto e 30 segundos. Com a regressão passam para a segunda gota com apenas etilenoglicol, onde fica mantido nessa gota até o envase.

No momento o envase é realizado nas primeiras duas colunas meio de etilenoglicol + HSOF, e na coluna do embrião apenas etilenoglicol. Após espera-se 10 minutos para colocar os embriões na máquina de congelamento lento, após, espera-se 2 minutos para realização do seeding (Figura 13A). Ao termino do seeding é então iniciada a curva de congelamento, após, deve esperar com que a máquina finalize a curva de congelamento, em média de 60 a 70 minutos.

Com o termino do congelamento os embriões são retirados da máquina e mergulhados em nitrogênio líquido (N₂), conforme mostra a figura 10B, assim são encaminhados para o estoque e armazenados em botijões de nitrogênio.

Figura 53 - Processo de seeding e retirada dos embriões da máquina de congelamento.

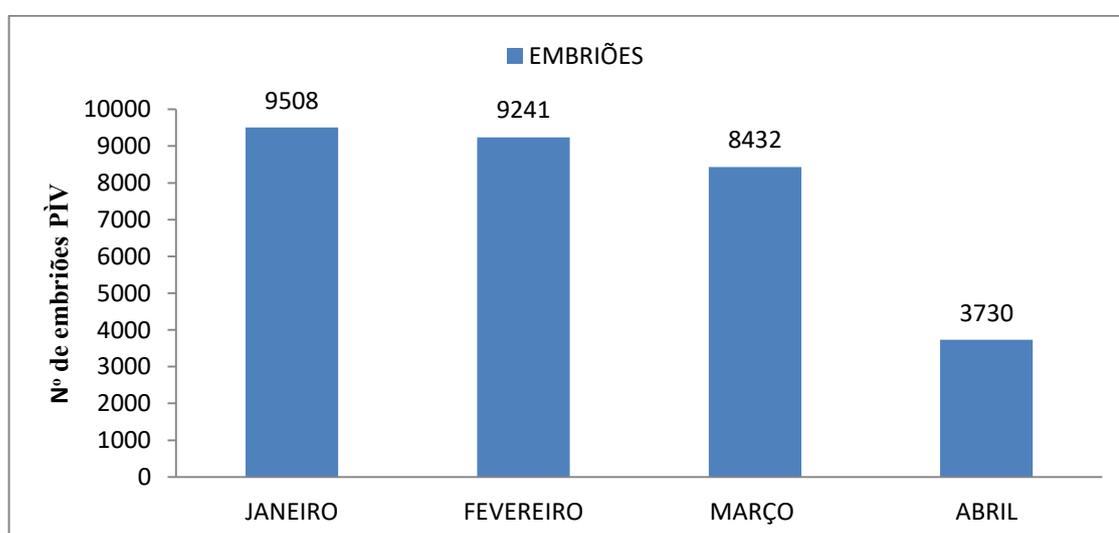


Fonte: O autor.

2. 3 Dados de produção da empresa durante período de estágio

Durante o período de estágio a empresa obteve resultados satisfatórios, onde durante a estação de monta atingiu suas metas. Os resultados obtidos no laboratório de Uberaba de Janeiro de 2019 a Abril de 2019 estão apresentados na Figura 11, período onde realizei o estágio na Unidade de Uberaba.

Figura 64 - Volume de embriões produzidos no laboratório de Uberaba – MG, durante o período de Janeiro a Abril de 2019.

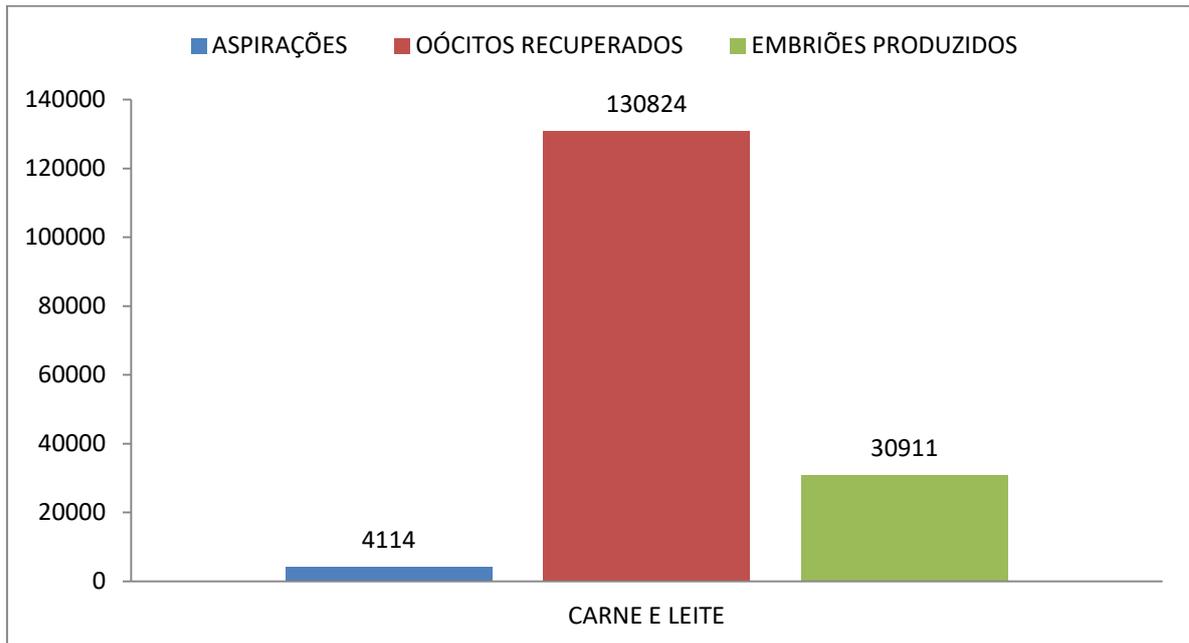


Fonte: ABS Pecplan.

Devido o término do estágio em 18 de abril os resultados levantados de produção de embrião da empresa mostrou-se menor (Figura 14). O perfil de clientes da empresa está voltado mais para o gado de corte, onde, possuí um maior volume nos animais de corte, principalmente animais de produção.

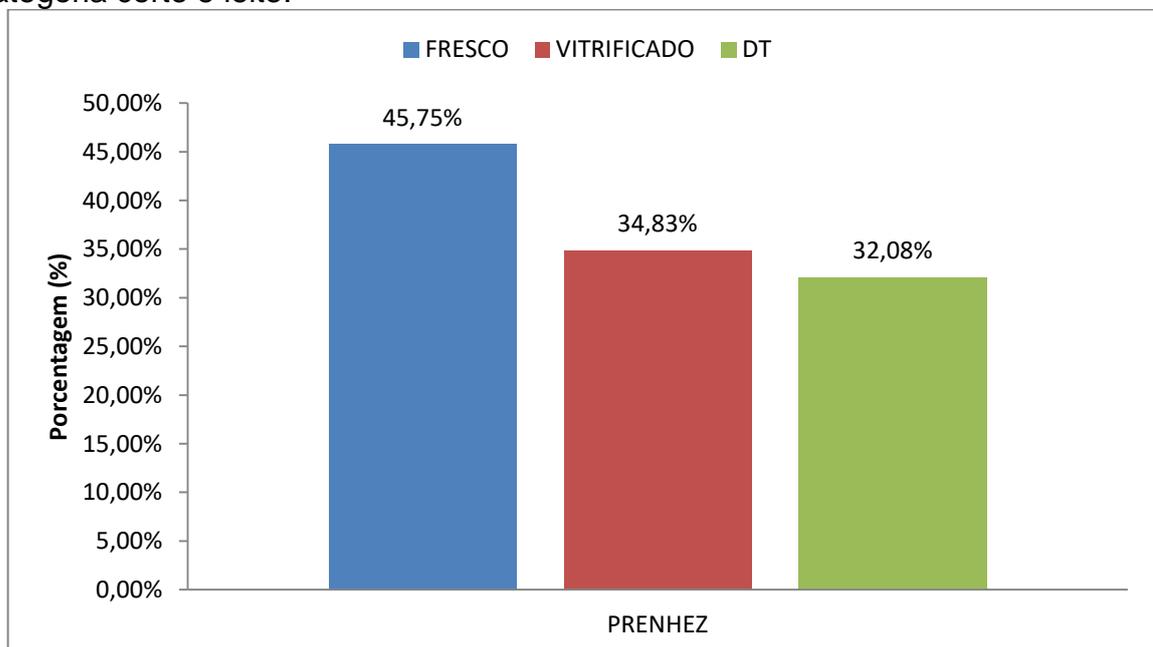
A empresa vem mantendo resultados quanto a produção muito consistentes, obtendo taxas de conversão de embriões de 23,5% quando juntamos animais de corte e leite (Figura 15). Resultado tem está associado o histórico de baixa produção de animais de alta produção de leite.

Figura 75 - Volume de embriões produzidos na categoria carne e leite.



Fonte: ABS Pecplan.

Figura 86 - Porcentagem de prenhez obtidos pela empresa no ano de 2019, na categoria corte e leite.



Fonte: ABS Pecplan.

Os resultados de prenhez obtidos pela empresa está dentro do esperado conforme a literatura já mostrou anteriormente (Figura 16). Os resultados obtidos de prenhez está diretamente na seleção adequada de receptoras no campo e a utilização apenas de embriões de qualidade para a transferência e congelamento.

3 DISCUSSÃO

3.1 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A PIVE é uma importante biotécnica para multiplicação de animais geneticamente superiores, aumentando dessa maneira o ganho genético dos plantéis. Através do uso de técnicas laboratoriais ocorre uma interação entre oócito e espermatozoides fora do trato reprodutivo da fêmea. Esta biotécnica também pode ser utilizada para obtenção de embriões e utilização em pesquisa básica, a fim de esclarecer o desenvolvimento embrionário e fisiologia reprodutiva (ROCHA-FRIGONI et al., 2014). Com sua utilização comercial é possível maximizar o potencial genético que fêmeas ou machos superiores podem oferecer, aumentando a eficiência produtiva dos rebanhos.

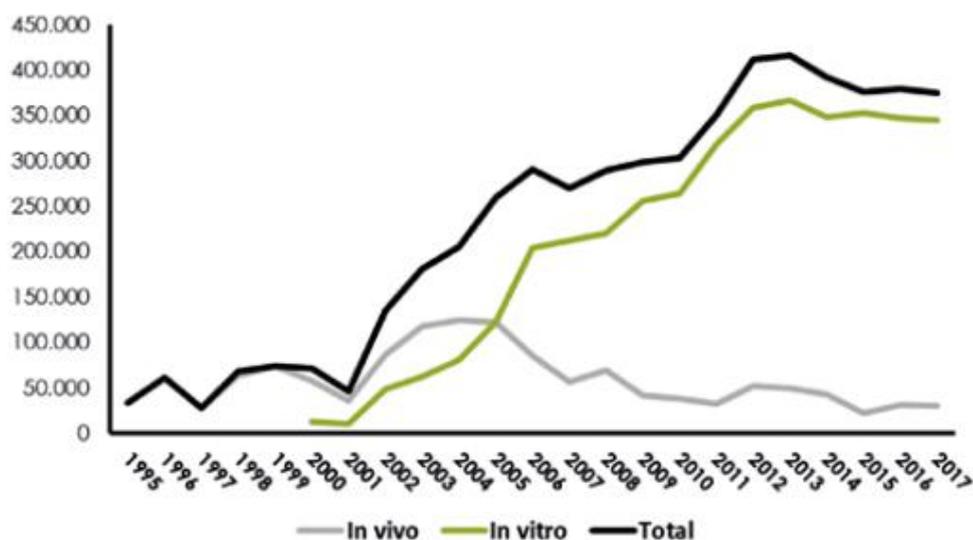
Animais de produção tiveram o primeiro indício de maturação e fecundação *in vitro* de oócito bovinos no final da década de 70. Já no ano de 1982 houve o nascimento do primeiro bezerro produzido por FIV, nos Estados Unidos, através de pesquisas com animais de laboratório (BRACKETT et al., 1982). Ainda nos anos 80 houve um crescimento da biotécnica, mostrando sua viabilidade. O Brasil teve o início do uso desta biotecnologia no ano de 1990, e desde então o país vem destacando-se no cenário mundial sendo o maior produtor de embriões PIV, produzindo cerca de 353.000 no ano de 2015 representando 60% da produção mundial conforme ilustra a figura 16 (IETS, 2016).

Através dessa biotécnica é possível obter embriões viáveis de fêmeas de alto mérito genético e acasalar com diferentes touros igualmente geneticamente privilegiados, representando uma de suas principais vantagens enquanto biotécnica. Desta forma, é possível obter um maior número de produtos viáveis de uma fêmea durante sua vida reprodutiva. Além disso, a técnica possibilita que fêmeas que estão até o terceiro mês de gestação possam ser aspiradas para a obtenção dos oócitos (MELLO et al., 2016).

Inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos visando aprimorar esta biotecnologia. A PIVE apresenta resultados relativamente baixos. De todo o volume de oócitos aspirados para a PIVE, apenas 30 a 40% deles passam pelas etapas de MIV, FIV e CIV, desenvolvendo-se até o estágio de blastocisto (SIRARD et al., 2006). Mesmo tendo uma baixa conversão de embriões/oócitos seu crescimento

vem sendo muito grande (Figura 17). Quando comparados com a produção *in vivo*, os embriões PIVE possuem uma pior qualidade e uma menor resistência. Existe uma relação desta piora na qualidade e resistência na manipulação em laboratório, onde se tenta mimetizar *in vitro* o ambiente que a fêmea proporcionada para esse embrião *in vivo* (DODE et al., 2013).

Figura 97 - Produção de embriões bovinos de 2000 a 2011.



Fonte: Adaptado de Viana 2012.

Portanto, o estudo do desenvolvimento embrionário e dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos deve ser constante visando o aprimoramento das técnicas laboratoriais empregadas na PIVE, tornando-se cruciais para o progresso e sucesso desta biotecnologia.

3.2 Maturação *in vitro*

Os oócitos são gametas femininos presentes no interior dos folículos pré antrais no ovário (SILVA, 2000). O desenvolvimento dos oócitos começa na vida fetal das fêmeas mamíferas. A obtenção dos oócitos visando a PIVE ocorre através da técnica de aspiração guiada por ultrassonografia, laparoscopia e laparotomia, ou ainda através de oócitos provenientes de ovários de fêmeas que foram para o abate. Na empresa, devido à coleta ser realizada em animais com mérito genético superior

e para a produção de embriões comerciais os oócitos eram obtidos através da aspiração guiada por ultrassonografia. Os oócitos eram transportados até o laboratório onde todos os processos para a produção do embrião eram realizados.

O processo de maturação *in vitro* é uma das fases mais importantes da PIVE, devido às várias modificações nucleares, moleculares e citoplasmáticas que tornam assim o oócito apto a ser fecundado (KUBELKA et al., 2000, GOTTARDI; MINGOTI, 2009). Nesta etapa de MIV o oócito passa por um processo que dura de 18-24 horas para atingir a maturação citoplasmática e nuclear (MERTON et al., 2003). Na MIV o objetivo é mimetizar o que ocorre na maturação *in vivo*, através da comunicação entre CCO e oócito (LODDE et al., 2013; THOMAS et al., 2004). Essa comunicação é feita através de junções comunicantes presentes no CCO (SUTTON et al., 2003), sendo mantida até 9 horas após a retomada da meiose (MACAULAY et al., 2014).

Ao mesmo tempo que o oócito passa por uma remodelação dentro do seu citoplasma, acontece uma remodelação nuclear. O início da maturação ocorre ainda dentro dos folículos. O oócito, apesar do crescimento folicular, permanece no estágio de diplóteno da prófase I, sendo a primeira parada da divisão meiótica (DODE et al., 2000). A maturação nuclear caracteriza-se como a retomada do estágio de diplóteno da prófase I, levando esse progresso até o estágio de metáfase II e liberação do primeiro corpúsculo polar (CHAVES, 2010; MEINECKE et al., 2001).

Todo o processo fisiológico que acontece dentro do oócito depende de um meio de cultivo que seja capaz de suprir as exigências da maturação, possibilitando o desenvolvimento de um embrião que poderá gerar uma prenhez. Atualmente, a maioria dos laboratórios de PIVE utilizam o meio TCM-199 para MIV. Entretanto, este meio não é suficiente para suprir todas as necessidades que o CCO precisa durante a maturação. Deste modo é necessário a suplementação com aditivos (GOTTARDI; MINGOTI, 2009). A adição de componentes ao meio é feita conforme cada laboratório, mas segundo Coelho et al. (2002) a adição de gonadotrofinas ao meio de maturação promove um efeito benéfico durante o processo de MIV e posteriormente a FIV e desenvolvimento embrionário.

Dentro da suplementação do meio MIV é necessário realizar a adição de uma fonte proteica, sendo as fontes mais utilizadas a albumina sérica bovina (BSA) e o soro fetal bovino (SFB). Por conta do desconhecimento da preciso da sua composição o meio utilizando estes componentes é chamado de meio indefinido.

Devido essa possível variação no meio, a produção de embriões também tende a ser variável. Mais uma desvantagem da utilização do soro é o maior acúmulo de conteúdo lipídico no interior do embrião (BARRONDO, 2013). Esta condição pode levar a uma menor qualidade do embrião produzido e uma baixa resistência à criopreservação. Para amenizar essas desvantagens, cada vez mais as pesquisas estão focadas para a eliminação do soro e o estabelecimento de meios definidos ou semi-definidos.

3.3 Fecundação *in vitro*

O processo de fecundação ocorre com a união do espermatozoide com o oócito, resultando assim na formação de um zigoto que pode alcançar o estágio de blastocisto. Para que seja possível a fecundação, o espermatozoide precisa estar capacitado. O processo de capacitação acontece no trato reprodutivo da fêmea, onde se dá a remoção dos fatores decapacitantes presentes no plasma seminal, proteínas e outras substâncias que estão presentes recobrando a membrana do espermatozoide (VARAGO et al., 2008).

Para realização da fecundação *in vivo* o espermatozoide experimenta modificações bioquímicas ao longo do trajeto pelo trato reprodutivo da fêmea até a ampola do oviduto, nesse trajeto verificam-se alterações da fluidez do teor lipídico da membrana plasmática do espermatozoide levando à hiperativação, concomitante a ligação do espermatozoide ao oócito, resultando na reação acrossômica (RA) (RODRIGUES et al., 2016). Com a ligação do espermatozoide ao oócito e ativação da RA, a glicoproteína ZP3 presente na zona pelúcida desencadeia a liberação de enzimas capazes de permitir a penetração do espermatozoide ao oócito, assim permitindo a fecundação (GONÇALVES et al. 2008). *In vitro* a capacitação espermática acontece através do auxílio de substâncias, como a heparina, um glicosaminoglicano presente no trato reprodutivo de fêmeas bovinas (VARAGO et al., 2008).

No laboratório da ABS era utilizado ainda epinefrina, responsável pelo aumento do número de espermatozoides que atingem a RA, e a hipotaurina, que eleva a motilidade espermática (GORDON, 2003). Os métodos de seleção espermática utilizados na PIVE possuem como objetivo a remoção do plasma seminal e os crioprotetores presentes e a seleção dos espermatozoides viáveis.

Entre os métodos mais comuns estão o gradiente descontínuo de Percoll, *Swim up* ou migração ascendente e o método de lavagem por centrifugação. Dentro do laboratório da ABS o método de seleção espermática utilizado era o Percoll.

Segundo Dode et al. (2002) os métodos citados acima foram comparados em relação as taxas de fecundação e tempo de co-cultivo dos oócitos e espermatozoides. Assim apontou que houve influência do método de seleção espermática na taxa de clivagem embrionária. Entretanto, o período de co-cultivo que apresentou melhores resultados foi entre 12-18 horas de incubação, dentro do laboratório da ABS o período de incubação não poderia ser superior a 18 horas.

No processo de seleção espermática que foi acompanhado durante o ECSMV, a amostra do sêmen não passava por análise de motilidade e vigor, assim não obedecendo as recomendações estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). O técnico do laboratório apenas fazia uma análise visual de motilidade e por meio do histórico do touro determinava, de forma subjetiva, dose inseminante. Não era considerada a concentração espermática para a inseminação, sendo sugerida por Camargo e colaboradores (2002) a dose de 1 a 2×10^6 espermatozoide/mL, que levariam a melhores taxas de clivagem e diminuindo a ocorrência de polispermia.

3.3 Cultivo *in vitro* e desenvolvimento embrionário

O cultivo *in vitro* é a etapa mais longa do processo de PIVE, que compreende a fecundação do oócito por um espermatozoide até o estágio de blastocisto (SANGILD et al., 2005). Para que chegue ao estágio de blastocisto são necessárias uma que aconteça a penetração do espermatozoide no oócito, acontecendo uma série de modificações culminam com a descondensação da cromatina e formação do pró-núcleo masculino (HAFEZ, 2004). Ainda, acrescenta-se que o oócito retoma sua divisão meiótica expulsando o segundo corpúsculo polar e assim formando o pró-núcleo feminino. Os pró-núcleos realizam uma aproximação levando à singamia que dará origem a um zigoto (SARTORI; DODE, 1995). No estágio de zigoto iniciam-se as divisões mitóticas chamadas de clivagem, gerando assim células embrionárias denominadas blastômeros (GONÇALVES et al., 2008).

Ao longo da primeira semana depois pós-fecundação ocorre o desenvolvimento embrionário através das divisões celulares. Durante a mitose, na

fase de 8-16 células, ocorre a ativação do genoma embrionário (transição materno-zigótica) (BLONDIN; SIRARD, 1995; BREVINI-GANDOLFI; GANDOLFI, 2001). A compactação dos blastômeros no estágio de mórula marca o início da primeira diferenciação celular com a formação de uma cavidade com a presença de fluido no seu interior, denominada de blastocele (GARCIA et al., 2004). Com o surgimento da blastocele o embrião recebe o nome de blastocisto (SANGILD et al., 2005), e ao longo do desenvolvimento passará pelos estádios de blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl), blastocisto expandido (Bx) e Blastocisto eclodido (Be) conforme a descrição no quadro 2.

Dentro do sistema de produção *in vitro* de embriões é preciso mensurar a eficiência do processo, normalmente mensurada através da taxa de embriões produzidos durante o CIV. O sistema costuma ser avaliado quanto à capacidade do meio de cultivo de nutrir de forma eficaz o embrião em desenvolvimento durante os 7 dias de cultivo. Neste sentido, os meios de cultivo estão sempre sendo melhorados, buscando aumentar a qualidade e quantidade de embriões produzidos. Dentre os meios utilizados estão: SOF, meio de cultivo celular (TCM), CR1aa, Ham's F – 10, e entre outros. A adição de substratos energéticos, proteínas, aminoácidos essenciais e não essenciais, são de extrema importância para o processo (MACHADO, 2012).

O uso do soro fetal bovino (SFB) em meios de desenvolvimento embrionário, além de fonte proteica, tem como objetivo fornecer substratos energéticos, aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento e quelantes de metais pesados. No entanto, a presença e a concentração desses componentes podem variar entre os lotes (MUCCI et al., 2006). Ainda, pode levar a desvios metabólicos e acúmulo de lipídios de forma excessiva (ABE et al., 2002) e posteriormente a uma diminuição na sobrevivência do embrião após a criopreservação (RIZOS et al., 2002), bem como causar anomalias fetais e gigantismo (síndrome do terneiro grande), levando à distocias.

Mesmo assim, a utilização do SFB implica em vantagens para o meio de cultivo, tais como aumento das taxas de produção de blastocistos quando comparado com outros sistemas sem sua presença. Para amenizar o prejuízo da remoção do SFB, a adição de BSA no meio de cultivo visa eliminar as variações na concentração de ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos e vitaminas

presentes nos diferentes lotes de SFB afetando os resultados de produção (MACHADO, 2012).

Nas fases iniciais do crescimento embrionário, até 16-32 células, as fontes energéticas fornecidas para suprirem as clivagens são o lactato e o piruvato. No decorrer do desenvolvimento, posteriormente à diferenciação celular, deve-se utilizar a glicose como substrato energético (LANE; GARDNER, 2007).

Ainda em relação ao sistema de cultivo, pode ser utilizados cultivo individual, ainda podendo haver trocas parciais de meios ou totais. Dentro da empresa não eram disponibilizadas informações sobre os meios utilizados em nenhum dos processos relatados.

3.3.1 Competência e qualidade embrionária

Avaliação de embriões tem sido amplamente explorada na estimativa de qualidade, viabilidade e competência embrionária, previamente ao período de implantação. Identificar os embriões que têm uma maior chance de gerar uma prenhez é extremamente importante, e pode levar à otimização do tempo, acelerando programas de melhoramento genético e reduzindo perdas financeiras associadas ao uso das técnicas voltadas para a PIVE. Além disso, realizar uma valorização dos embriões produzidos de forma comercial (VAN SOOM et al., 2001).

Para realizar a avaliação morfológica de embriões seja ele bovino ou de outras espécies é necessária a utilização de um estereomicroscópio, assim, pode ser feita a análise morfológica de embriões viáveis e não viáveis para a transferência. Essa prática é extremamente útil na transferência de embriões bovinos e humanos (ALIKANI et al., 1999). Mesmo sendo uma forma consolidada de avaliação de embriões, por consistir em abordagem subjetiva, conforme observado em casos de embriões com morfologia inadequada também resultarem em prenhez (FARIN et al., 1999).

Além da morfologia deve ser levado em consideração a taxa de clivagem e de blastocisto para avaliação da competência embrionária (ALIKANI et al., 2002). Alguns estudos levam em consideração a velocidade do desenvolvimento embrionário, onde, embriões que se desenvolvem em ritmo moderado são mais competentes em relação aqueles que se desenvolvem com cinética embrionária muito lenta ou muito rápida (CUMMINS et al., 1986; WEITZMAN et al., 2010).

Segundo Holm et al. (1999) embriões que demonstram uma cinética acelerada, possuem um menor número de células e deficiência no número de blastômeros quando comparados com a produção *in vivo*, levando a uma diferença na conversão a blastocisto. Uma avaliação que ainda pode ser realizada é a taxa de eclosão. Essa deve ser realizada no dia 8 do cultivo, assim os embriões que não eclodirem até esta data são considerados de pior qualidade em relação aos que eclodem (VAN SOOM et al., 1997).

Inúmeras são as possíveis causas para levar à morte embrionária. Defeitos intrínsecos do embrião, ambiente materno, assincronia entre receptora e embrião, entre outros. Mas em casos de embrião PIVE as falhas podem ser mais evidentes, onde a maioria dos incidentes de mortalidade acontece até 3 semanas após a fecundação (HANSEN et al., 2010). A falta de capacidade de gerar uma prenhez após a transferência consiste em um problema relevante, uma vez que taxas de prenhez de transferências a fresco *in vitro* são inferiores às *in vivo* (LONERGAN et al., 2007; PONTES et al., 2009). Para obter bons resultados não deve ser levado em consideração apenas boas taxas de produção de blastocisto, mas sim obter embriões com competência embrionária superior, para gerar e manter a prenhez, proporcionando assim o nascimento de animais saudáveis (HANSEN et al., 2010).

Diversos fatores são relacionados à competência embrionária. A interação do embrião com os meios de MIV, FIV e CIV é responsável por muitas alterações morfológicas, essa relação pode ser derivada de um ambiente de cultivo ineficiente (RIZOS et al., 2002). Alterações morfológicas e moleculares causadas pelo meio de cultivo *in vitro* têm sido responsabilizadas pela redução da qualidade e viabilidade após inovulação ou criopreservação dos embriões (MCEVOY, 2003). Entre as alterações estão podemos citar o aumento do número de células em apoptose e diminuição no número de células totais, alterações da densidade, aumento do acúmulo lipídico (ABE et al., 2002), alterações do metabolismo e expressão gênica (LONERGAN et al., 2007; KHURANA e NIEMANN, 2000; RIZOS et al., 2003). Estudos apontam uma maior incidência de células apoptóticas em embriões produzidos *in vitro* quando comparados com a produção *in vivo* (LONERGAN et al., 2003; RIZOS et al., 2002, 2003).

Portanto embriões que possuem um maior número celular apresentam uma maior probabilidade de manter a gestação (VAN SOOM et al., 1997). Assim, a

contagem total de células tem sido utilizada como um marcador de viabilidade embrionária (KHURANA e NIEMANN, 2000; CORRÊA et al., 2008).

A alta sensibilidade de embriões PIVE à criopreservação é mais um fator limitante da técnica que compromete a viabilidade embrionária. Esta sensibilidade é fortemente associada principalmente ao elevado conteúdo lipídico presente no citoplasma do embrião PIVE, caracterizado por diversas diferenças estruturais, fisiológicas e metabólicas. Podem ser mencionadas entre as diferenças a maior quantidade de vacúolos, expressão de comunicações internas menor, reduzida compactação, quantidade de células totais menor e zona pelúcida frágil (ABE et al., 2002). Ainda tendo maior taxa de apoptose e maior teor lipídico, assim, reduzindo sua criotolerância (MUCCI et al., 2006; SUDANO et al., 2011).

Como citado anteriormente, o meio de cultivo pode alterar a qualidade do embrião PIVE. O uso do SFB no meio de cultivo pode levar ao aumento do conteúdo lipídico no interior dos blastômeros, levando o embrião a ser sensível às práticas de congelamento, seja pelo fornecimento de ácidos graxos no meio, ou por distúrbios no metabolismo mitocondrial (ABE et al., 2002).

3.4 Criopreservação de embriões

Mesmo que a produção *in vitro* e a criopreservação de embriões sejam técnicas bem consolidadas, ainda existem fatores limitantes para o desenvolvimento embrionário adequado quando comparamos com a produção *in vivo*. A criopreservação de embriões é uma biotécnica utilizada para a conservação de embriões em nitrogênio (N₂), prolongando a viabilidade a longos períodos de tempo. Possibilita resolver problemas de logística associadas à transferências a serem realizadas em locais muito distantes e/ou de um número muito grande de embriões. Ainda viabiliza a expansão da comercialização de embriões, sendo ela nacional ou internacional (SUDANO et al., 2013). Possui como vantagem também a otimização das biotecnologias reprodutivas, podendo fazer estoque de material genético de animais superiores em seu potencial zootécnico.

O primeiro relato de sobrevivência de embriões criopreservados foi feito em camundongos, onde foram submetidos com sucesso ao congelamento e aquecimento (WHITTINGHAM et al., 1971). Com o passar dos anos as técnicas começaram a ser aplicadas em diferentes espécies, assim tomando amplitude

comercial em algumas espécies de interesse econômico. Conforme Viana (2018) a maior parte da produção de embriões *in vitro* ainda são transferidos a fresco, mas os embriões congelados alcançam cerca de 33,7% e segue em uma tendência de crescimento.

A criopreservação tem como princípio a redução da temperatura seguida de uma severa queda do metabolismo celular, mantendo um estado bioquímico em que as reações celulares são mantidas ao mínimo. Neste estado possibilita que o material genético fique armazenado por tempo indeterminado, tendo a capacidade de estabelecimento das funções celulares após o aquecimento (SUDANO et al., 2016). Assim a criopreservação possui dois fatores principais: taxas de congelamento/aquecimento e escolha adequada de crioprotetores (VAJTA; KUWAYAMA, 2006).

Embora o uso de crioprotetores seja fundamental em protocolos de criopreservação, os mecanismos que levam à proteção celular, bem como a toxicidade e o metabolismo celular não estão totalmente esclarecidos e abordados na literatura (CASTRO et al., 2011). De acordo com a capacidade de penetração de membrana os crioprotetores são divididos em dois grupos: Intracelular ou permeáveis (glicerol, etilenoglicol e propilenoglicol), e extracelular ou impermeáveis (sacarose, polietilenoglicol e polivinilpirrolidona).

Além disso, existem duas metodologias que podem ser utilizadas para a criopreservação de embriões, vitrificação e congelamento lento. Estas técnicas serão elucidadas e seus princípios na sequência.

3.4.1 Vitrificação

O processo de vitrificação consiste em um congelamento que dura 1 minuto e 20 segundos, com altas concentrações de crioprotetores, que é capaz de desidratar de forma muito rápida as células embrionárias e diminuindo danos com a formação dos cristais de gelo. Mesmo sendo uma das biotécnicas mais utilizadas para a criopreservação de embriões PIVE, ainda possui limitações, sendo dois fatores cruciais para o sucesso da técnica: as lesões de resfriamento e formação dos cristais de gelo a partir de uma desidratação inadequada (VAJTA, 2000).

Mesmo sendo uma técnica muito utilizada não possibilita a transferência direta devido à necessidade do aquecimento dos embriões e envase previamente à

inovulação. Possui ainda como complicação da técnica a toxicidade dos crioprotetores utilizados em grande quantidade no meio de vitrificação, apesar da exposição do embrião aos crioprotetores por um intervalo muito curto de tempo e com um volume mínimo da solução (VAJTA et al., 1998).

Como forma de garantir uma taxa de resfriamento rápida e apropriada, o uso de um volume mínimo de meio junto ao embrião é adotado para uma eficiente troca de temperatura com N₂. Com esse propósito, muitas ferramentas foram desenvolvidas especificamente para carregar os embriões em microgotas, são elas: *Open Pulled Straw* (OPS) (VAJTA et al., 1998), *Cryoloop* (LANE et al., 1999) e *Criotop* (KUWAYAMA, 2007).

Dentro da empresa, a técnica utilizada era a proposta por Vajta et al. (1998), onde o embrião e a solução tem contato direto com o nitrogênio, trazendo boas taxas de re-expansão e tendo um custo baixo. Mas, a abordagem de um volume mínimo proposta pelo método de *Criotop* aumenta as taxas de resfriamento e aquecimento do embrião, contribuindo assim para a sobrevivência e desenvolvimento do embrião submetido ao processo (KUWAYAMA, 2007).

3.4.2 Congelamento Lento

Conhecido também como congelamento clássico ou tradicional, o congelamento lento vem sendo empregado desde 1972, quando foi desenvolvido por Whittingham (1971).

A utilização desta biotécnica facilita as transferências a campo, devido sua praticidade para o descongelamento. Para realizar o congelamento do embrião são utilizados crioprotetores como o DMSO, etilenoglicol e propilenoglicol. As concentrações na maioria dos protocolos são baixas, sendo adicionados ao meio de cultivo (SARAGUSTY; ARAV, 2011).

Conforme Mazur (1984) a concentração do soluto extracelular está relacionado com equilíbrio osmótico, assim, determina a velocidade em que a água sai da célula. Deste modo, as concentrações baixas de crioprotetores proporcionam a desidratação lenta e gradual da célula.

Iniciando o procedimento, começa o resfriamento que alcança em média 2°C por minuto, com a temperatura entre -4 e -9°C. Assim deve ser incubado por 10 minutos mantendo um ponto de equilíbrio e estabilidade térmica. Neste momento

realiza-se a indução manual da cristalização, denominado *seeding* (JONDET et al., 1984). O *seeding* é extremamente importante para evitar danos no momento do resfriamento excessivo e a desidratação intensa da célula (SANTOS et al., 2007). Após a realização da cristalização a temperatura continua reduzindo, em uma velocidade de $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ visando a remoção adequada de água.

O congelamento intracelular ocorre entre -30 e -80°C , evitando a formação de cristais de gelo, danos tóxicos e osmóticos dentro da célula, e possibilitando o armazenamento em N_2 (MAZUR, 1984; VAJTA; KUWAYAMA, 2006).

O processo de congelamento lento é longo e requer investimento em máquinas para a realização do procedimento. Mesmo tendo limitações quanto à formação de cristais de gelo, sua aplicação em larga escala e facilidade de aquecimento torna a técnica aplicável em larga escala. Ressalta-se que na criopreservação de embriões *in vivo* os resultados são semelhantes, seja no congelamento lento ou na vitrificação (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 1997).

Dentro da ABS Pecplan a biotécnica de congelamento lento ou *Direct Transfer* é tratada como “carro chefe” da empresa, e tem sido implementada em parcerias com grandes criatórios detentores de rebanhos com reconhecido mérito genético. Desta forma a empresa disponibiliza para o mercado venda de embriões fruto de bancos genéticos consolidados através da técnica de DT. Considerando que a DT apresenta resultados semelhantes à vitrificação (Figura 17), é possível observar o avanço no desenvolvimento dos meios utilizados para o DT na empresa.

4 CONCLUSÃO

Utilizar as biotecnologias aplicadas à reprodução incrementa ganhos genéticos, produtivos e reprodutivos de um rebanho. Assim, quando bem empregadas, podem representar um diferencial para as propriedades que fazem uso das mesmas.

Durante o período de estágio foi possível acompanhar e realizar atividades tanto laboratoriais como a campo, contemplando as principais biotecnologias e serviços que a empresa disponibilizava para seus clientes. Além disso, a convivência diária com profissionais extremamente práticos e qualificados proporcionou uma experiência pessoal e tecnicamente significativa para a minha formação.

Portanto, conclui-se que a experiência vivenciada junto às atividades desenvolvidas no local de estágio foi extremamente importante na complementação de todo meu conhecimento adquirido, interpessoal e social. Diante disto, afirmo que o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária foi fundamental na formação acadêmica, profissional e pessoal, possibilitando a reflexão com senso crítico acerca da área escolhida e do cenário encontrado além das fronteiras seguras e acolhedoras da Universidade.

5 REFERÊNCIAS

ASBIA - Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Index ASBIA mercado 2014. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/wp-content/uploads/2018/10/INDEX-ASBIA-2017_completo.pdf> . Acesso: 17 fev. 2019.

ABE, H. et al. Accumulation of Cytoplasmic Lipid Droplets in Bovine Embryos and Cryotolerance of Embryos Developed in Different Culture Systems Using Serum-Free or Serum-Containing Media. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 1, p. 57–66, 2002.

ALIKANI, M. et al. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. **Fertility and Sterility**, v. 71, n. 5, p. 836–842, 1999.

BARRONDO, Maite del Collado. Influência de diferentes suplementos na maturação oocitária sobre o acúmulo de lipídeos citoplasmáticos em oócitos e embriões bovinos cultivados *in vitro*. **Dissertação de mestrado**. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/98173/000735355.pdf?sequenc e=1>> Acesso em: 15 abr. 2019.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 41, n. 1, p. 54–62, 1995.

BRACKETT, B. G. et al. Normal Development Following In Vitro Fertilization in the Cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 147-158, 1982.

BREVINI-GANDOLFI TAL, GANDOLFI F.. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, p. 1255-1276, 2001.

CASTRO, S., et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae** v. 39, 2011.

CAMARGO, L. S. A. et al. Efeito de concentração espermática e período de incubação oócito-espermatozoides na fecundação in vitro em bovinos da raça Gir. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 5, p. 709-715, maio 2002.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ª edição, Belo Horizonte, 2013.

CHAVES, A. B. G. Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 1, p. 37-49, jan./mar. 2010.

COELHO, L. A. et al. Produção *In Vitro* de Embriões Bovinos: Utilização de Diferentes Fontes de Gonadotrofinas na Maturação dos Oócitos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1117-1121, 2002.

CORRÊA, G. A. et al. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2–4, p. 132–142, 2008.

CUMMINS, J.M., et al. A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison, with visual estimates of embryo quality. J In **Vitro Fert Embryo Transf**, v. 3, p. 284–295, 1986.

DODE, M. A. N. et al. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 37, n. 2, p. 145-150, abr./jun. 2013.

DODE, M. A. N. et al. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction Science** v. 69, p.15–23, 2002.

DODE, M. A. N. et al. Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 207-214, jan. 2000.

FARIN, P. W. et al. Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Theriogenology**, v. 52, p. 659–670, 1999.

FLEMING A. D. SR, KUEHL T.J. Maturation of baboon or cow oocytes transplanted into a surrogate. **Theriogenology**, v. 23, p.192, 1985.

GARCIA, J. M. et al. **Estado da arte da fertilização in vitro em bovinos**. In: Biotecnologia da Reprodução em Bovinos (1º simpósio internacional de reprodução animal aplicada). Anais... 2004.

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 à Reprodução Animal**, 2ª ed. São Paulo: ROCA, p. 261-291, 2008.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. 2ª edição. **Wallingford: CAB International**, p. 548, 2003

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n. 2, p. 82-94, abr./jun. 2009.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7ª edição. Barueri-SP: Manole, 2004.

HANSEN, P. J. et al. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of in vitro-produced embryos for post-transfer survival in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 59, 2010.

HOLM, P. et al. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v. 52, p. 383-700, 1999.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sala de imprensa, notícias: Rebanho bovino alcança a marca recorde de 214,9 milhões de cabeças. 2018. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/22648-ppm-2017-rebanho-bovino-predomina-no-centro-oeste-e-mato-grosso-lidera-entre-os-estados>>. Acesso em: 17 jun. 2019.

IETS – Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. **2015 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals**. 2016. Disponível em: <http://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_2015_V2.pdf>. Acesso em: 28 de fev. 2019.

KUBELKA M, et al. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biol Reprod**, v. 62, p. 292-302, 2000

KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 73–80, 2007.

Lane, M. et al. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. **Fertility and sterility** V. 72, P. 1073-1078, 1999.

LANE, M.; GARDNER, D. K. Embryo culture medium: which is the best? **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 21, n. 1, p. 83-100, 2007.

LODDE, V. et al. Role of gap junction-mediated communications in regulating large-scale chromatin configuration remodeling and embryonic developmental competence acquisition in fully grown bovine oocyte. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, n. 9, p. 1219–1226, 2013.

LONERGAN, P. et al. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**. v. 65, p. 137–152, 2003

LONERGAN, P. et al. 243Temporal Divergence in the Pattern of Mrna Expression in Bovine Embryos Cultured From the Zygote To Blastocyst Stage in Vitro or in Vivo. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, n. 2, p. 242, 2004.

LONERGAN, P. et al. Effect of embryo source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 7, p. 861, 2007.

MACAULAY, A. D. et al. The Gametic Synapse: RNA Transfer to the Bovine Oocyte1. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 4, p. 1–12, 2014.

MACHADO, Grazieli Marinheiro. Cultivo pós-eclosão de embriões bovinos produzidos in vitro: aspectos morfológicos e moleculares. **Tese de doutorado em ciências animais**, Brasília, abril 2012. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/11067/1/2012_GrazieliMarinheiroMachado.pdf> Acesso em: 22 abr. 2019.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **The American journal of physiology**, v. 247, n. 3 Pt 1, p. C125-42, 1984.

MCEVOY, T. G. Manipulation of Domestic Animal Embryos and Implications for Development In Vitro Embryo Production – Consequences. **Animal Biology**, v. 275, p. 268–275, 2003.

MEINECKE, B. et al. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. **Reprod Domest Anim**, v.36, p.183-188, 2001.

MELLO, R. R. C. et al. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.40, n.2, p.58-64, abr./jun., 2016.

MERTON, J. S. et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 651–674, 2003.

MUCCI, N. et al. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1551–1562, 2006.

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.414-421, 2010.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrate on cleavage and morula blastocyt formation of bovine embryos, n. 215, p. 3, 2000.

PONTES, J. H. F. et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690–697, 2009.

RIZOS, D. et al. Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression1. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 1, p. 236–243, 2002.

RIZOS, D. et al. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 236-243, 2003.

RIZOS, D. et al. Analysis of Differential Messenger RNA Expression Between Bovine Blastocysts Produced in Different Culture Systems: Implications for Blastocyst Quality¹. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 3, p. 589–595, 2005.

ROCHA-FRIGONI, N. A. S. et al. Produção *in vitro* de embriões ovinos: avanços e desafios. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 38, n. 2, p. 103-109, abr./jun., 2014.

RODRIGUES, R. et al. In vitro embryo production in cattle. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 40, n. 2, p. 58–64, 2016.

SANGILD, P. T. et al. Blood Chemistry, Nutrient Metabolism, and Organ Weights in Fetal and Newborn Calves Derived from In Vitro-Produced Bovine Embryos¹. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1495–1504, 2005.

SANTOS, R. R. et al. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. **Cell and Tissue Research**, v. 327, n. 1, p. 167–176, 2007.

SARAGUSTY, J.; ARAV, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v. 141, n. 1, p. 1–19, 2011.

SARTORI, R.; DODE, M. A. N. Mortalidade embrionária na IA, TE, FIV e clonagem. n. April, p. 175–194, 1995.

SEVERO, N. C. História da inseminação artificial no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 39, n. 1, p. 17-21, jan./mar 2015.

SILVA, J.R.V. et al.. Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved in situ. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 809-822, 2000.

SIRARD, M. A. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, p. 126-136, 2006.

SPRÍCIGO, J. F. W. et al. Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 86, p. 2054–2062, 2016.

STOJKOVIC, M. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 904-909, 2001.

SUDANO, M. J. et al. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1211–1220, 2011.

SUDANO, M. et al. Improving postcryopreservation survival capacity: an embryo-focused approach. **Anim. Reprod**, v. 10, n. 3, p. 160–167, 2013.

SUDANO, M. J. et al. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro - and in vivo -produced blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, p. 1129–1141, 2014.

SUDANO, M. J. et al. Cryopreservation of Bovine Embryos. **Biotechnology of Animal Reproduction**, 1. ed. Nova York: Nova Science publishers, 2016, v. 1, p. 1-33.

SUTTON, M. L. et al. Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. **Reproduction**, v. 126, n. 1, p. 27–34, 2003.

THOMAS, R. E., et al. Bovine Cumulus Cell-Oocyte Gap Junctional Communication During In Vitro Maturation in Response to Manipulation of Cell-Specific Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Levels1. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 548–556, 2004.

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

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 357–364, 2000.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 236–244, 2006.

VAN SOOM, A., et al. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, n. 1, p. 47–56, 1997.

Van Wagtendonk-de Leeuw, A. et al. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. **Theriogenology** v. 48, p.1071-1084, 1997.

VARAGO, F. C., et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 2, p.100-109, abr./jun. 2008.

VIANA, J. H. Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo. **Comunicado técnico** 59 EMBRAPA, Juiz de Fora, MG, novembro, 2009. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/65449/1/COT-59-Classificacao-de-embrioes.pdf>>. Acesso em: 02 mai 2019.

VIANA, J.H., 2018. A produção de embriões bovinos em 2017: o mercado em stand-by. **Jornal o embrião** v. 62.

WEITZMAN, V. N. et al. Predictive value of embryo grading for embryos with known outcomes. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 2, p. 658–662, 2010.

WHITTINGHAM, DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, v. 233, p. 125–126, 1971.

Anexo-A: Certificado do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária**CERTIFICADO DE ESTÁGIO**

Certificamos que Diego Borba Müller concluiu o estágio obrigatório em Produção In Vitro de Embriões Bovinos, entre os dias 14/01/2019 a 18/04/2019, com carga horária de 536 horas, no laboratório de Biotecnologia de Reprodução da IVB Technologies.

18 de Abril de 2019

Maria Carolina Santos
Flávia Daniela R. dos Santos
Recursos Humanos

