

**UNIVERSIDADE REGIONAL DO NOROESTE DO ESTADO DO
RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE ESTUDOS AGRÁRIOS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

Ronaldo Junior da Silva

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

Ijuí, RS
2017

Ronaldo Junior da Silva

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

Relatório do estágio curricular supervisionado em Medicina Veterinária, Área de Clínica e Reprodução de Grandes Animais, apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Médico Veterinário**.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Med. Vet. Denize da Rosa Fraga

Ijuí, RS
2017

Ronaldo Junior da Silva

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

Relatório do estágio curricular supervisionado em Medicina Veterinária, Área de Clínica e Reprodução de Grandes Animais, apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUÍ, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Médico Veterinário**.

Aprovado em 18 de Novembro de 2017:

Denize da Rosa Fraga, Dra. (UNIJUÍ)
(Orientadora)

Roberta Carneiro da Fontoura Pereira, Dra. (UNIJUÍ)
(Banca)

Ijuí, RS
2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda minha família, especialmente aos meus pais, que com todo amor, carinho e incentivo, depositaram confiança e mesmo diante de tantas dificuldades, não mediram esforços e foram essenciais para que eu chegasse até este momento em minha vida.

Aos meus amigos e colegas por todo o apoio e incentivo durante esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho teve a ajuda e dedicação de várias pessoas, nas quais foram extremamente importantes para que houvesse a concretização deste estudo, onde de forma especial agradeço:

- a Deus, por quem sempre tive fé e que certamente esteve presente iluminando meus passos durante esta longa trajetória, sem a sua presença tudo seria mais difícil;

- aos meus pais Zaires e Neusa, que sempre estiveram presentes me incentivando e apoiando em todas as decisões, mesmo diante de todas as dificuldades não mediram esforços e foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Amo vocês incondicionalmente;

- ao meu padrinho Jairo, o qual sempre me incentivou a buscar um futuro melhor em minha vida, todos os seus conselhos me deram forças para que meus objetivos fossem alcançados;

- agradeço aos meus familiares que mesmo apesar da distância, sempre estiveram torcendo e me dando apoio para que este sonho se concretizasse;

- a minha orientadora Denize da Rosa Fraga pela orientação, paciência e incentivo o que tornaram possível a realização deste trabalho. Devo também gratidão pelo prazer que tive em acompanhá-la durante todos estes anos de faculdade, acreditou em minha capacidade e me fez criar gosto pela pesquisa, todos seus ensinamentos serão eternamente lembrados;

- aos professores da UNIJUÍ por todos os conhecimentos passados ao longo da graduação, todos foram essenciais para a minha formação. Agradeço imensamente!

- a todos os funcionários do Departamento de Estudos Agrários (DEAg/UNIJUÍ) pela amizade, auxílio e colaboração durante minha trajetória na graduação;

- ao Instituto Regional de Desenvolvimento Rural (IRDeR) por proporcionar toda a estrutura necessária para a realização das aulas práticas durante a vida acadêmica, as quais foram extremamente importantes para pôr em prática os conhecimentos teóricos vivenciados ao longo desta caminhada;

- agradeço de coração a todos meus amigos que sempre estiveram do meu lado ao longo da minha vida, em especial aos que conquistei ao longo da graduação. Serei eternamente grato pelo companheirismo e os mates nos momentos de estudos;

- ao pessoal do Grupo de Pesquisa em Saúde Animal por todas as trocas de conhecimentos e momentos de alegrias e diversões proporcionadas durante a graduação.

- a minha supervisora de estágio Doutora Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro pela oportunidade e os ensinamentos transmitidos de forma paciente ao longo do estágio;

- a toda equipe do Laboratório de Reprodução da Embrapa Clima Temperado, em especial aos pós-graduandos, Bruna Mion, Patrícia Gindri, Joao Alvarado Rincón e Jorgea Pradieé pelo apoio, paciência e trocas de experiências durante o estágio, serei eternamente grato e levarei para sempre a amizade de vocês;

- a Embrapa Clima Temperado pela recepção e oportunidade para realização do estágio, todo o conhecimento e experiência transmitida certamente será fundamental para meu crescimento pessoal e profissional;

- por fim, agradeço a todos que de alguma forma estiveram presentes e torceram para que o sonho de se tornar Médico Veterinário se tornasse realidade.

Muito obrigado à todos!

*“O sucesso nasce do querer, da determinação
e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e
vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis”.*

(José de Alencar)

RESUMO

RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

AUTOR: Ronaldo Junior da Silva
ORIENTADORA: Denize da Rosa Fraga

O Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária foi realizado no Laboratório de Reprodução da Embrapa Clima Temperado, localizado na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, no período de 24 de julho a 25 de agosto de 2017, totalizando 150 horas de atividades, na área de Clínica e Reprodução Animal, com ênfase a produção *in vitro* de embriões (PIV). A supervisão interna ficou sob responsabilidade da Médica Veterinária Doutora e Pesquisadora da Embrapa Clima Temperado Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro e sob a orientação da Doutora professora Médica Veterinária Denize da Rosa Fraga. O estágio teve como objetivo principal a aplicação dos conhecimentos teóricos e práticos adquiridos durante a formação acadêmica, possibilitando o contato e a troca de experiências com profissionais qualificados e permitindo assim, aprimorar conhecimentos sobre o uso das biotécnicas reprodutivas, especialmente a rotina que envolve a PIV. Durante o estágio foram desenvolvidas atividades que serão expressas em forma de tabelas, sendo nestas apresentadas as atividades acompanhadas. Para o desenvolvimento deste relatório foi selecionada para a discussão a técnica de PIV, sendo descrita a rotina do laboratório acompanhado durante o estágio e comparada a literatura. A realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária proporcionou grande aprendizado junto à formação acadêmica, promovendo o crescimento pessoal e profissional, juntamente com a troca de conhecimentos e experiências entre acadêmicos, estudantes de pós-graduação e supervisora, permitindo assim, vivenciar o emprego de novas biotecnologias reprodutivas que cada vez mais ganham espaço no mercado e são fundamentais para o sucesso na área da reprodução animal.

Palavras-chave: Produção *in vitro*. Reprodução. Embriões. Bovinos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades laboratoriais desenvolvidas durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária, realizado na Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, no período de 24 de julho a 25 de agosto de 2017.....	13
Tabela 2 - Atividades clínicas e reprodutivas desenvolvidas a campo durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária, realizado na Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, no período de 24 de julho a 25 de agosto de 2017.....	14
Tabela 3 - Atividades complementares desenvolvidas durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária, realizado na Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, no período de 24 de julho a 25 de agosto de 2017.....	14

LISTA DE ANEXOS

Anexo A	– Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.....	38
Anexo B	– Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Terras Baixas Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.....	39
Anexo C	– Aspiração folicular de ovário bovino realizado durante o Estágio no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.....	40
Anexo D	– Bomba de vácuo utilizada para a realização da aspiração folicular no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.....	41
Anexo E	– Seleção de oócitos bovinos realizada durante o Estágio no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.....	42
Anexo F	– Estufa de cultivo de embriões do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.....	43
Anexo G	– Avaliação da concentração espermática na câmara de Neubauer realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.....	44
Anexo H	– Avaliação da clivagem de embriões bovinos durante o Estágio realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio grande do Sul, Brasil.....	45
Anexo I	– Avaliação de embriões bovinos produzidos durante o Estágio no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.....	46
Anexo J	– Certificado do Minicurso de Inseminação Artificial em Tempo Fixo realizado durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.....	47
Anexo L	– Certificado do Seminário de Bioseguridade na Cadeia Produtiva do Leite realizado durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.....	48
Anexo M	– Atestado de conclusão do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária.....	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	13
3	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	16
3.1	INTRODUÇÃO	16
3.2	DESENVOLVIMENTO.....	18
3.2.1	Transporte e aspiração folicular de ovários	18
3.2.2	Procura e seleção de oócitos	20
3.2.3	Maturação <i>in vitro</i> de oócitos	21
3.2.4	Fecundação <i>in vitro</i> de oócitos.....	23
3.2.5	Preparação do sêmen	25
3.2.6	Preparação do gradiente de Percoll®	25
3.2.7	Seleção e avaliação da concentração espermática	26
3.2.8	Cultivo <i>in vitro</i> de embriões	27
3.2.9	<i>Feeding</i>	28
3.3.0	Clivagem de embriões	29
3.3.1	Avaliação do desenvolvimento embrionário.....	29
3.3	CONCLUSÃO	31
3.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
4	CONCLUSÃO	34
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
6	ANEXOS	38

1 INTRODUÇÃO

O estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária foi realizado no período de 24 de Julho a 25 de Agosto de 2017, totalizando 150 horas de atividades. O local da realização do estágio foi na Embrapa Clima Temperado na área de Clínica e Reprodução Animal. A supervisão interna ficou sob responsabilidade da Médica Veterinária Doutora e Pesquisadora Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro e sob a orientação da Médica Veterinária professora Doutora Denize da Rosa Fraga.

A Embrapa Clima Temperado está situada na BR 392, Km 78, na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. O Laboratório de Reprodução Animal (Anexo A) está localizado na subunidade Estação Experimental Terras Baixas (ETB) da Embrapa Clima Temperado (Anexo B), no município de Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. A ETB dispõe de uma área total de 3485,7 hectares (ha). No Laboratório de Reprodução da ETB são desenvolvidas pesquisas envolvendo a área de biotecnologia da reprodução, destacando-se as pesquisas envolvendo a produção *in vitro* de embriões. Esse setor é constituído por um laboratório e uma área de campo.

O Laboratório de Reprodução é dividido em um escritório (recepção), sala de limpeza e esterilização de materiais, sala de preparação de meios e armazenagem de reagentes e sala de cultivo de embriões. A área de campo é constituída pela unidade de manejo reprodutivo, onde estão presentes as vacas utilizadas para a realização das pesquisas e execução dos experimentos *in vivo* e pela Unidade de Multiplicação Genética (UMG), onde permanecem as ovelhas e carneiros, também utilizados a fins de pesquisa. Além desta área de campo, o Laboratório de Reprodução ainda conta com o apoio de instituições parceiras para a realização dos experimentos, como o Sistema de Pesquisa e Desenvolvimento em Pecuária Leiteira (SISPEL), com uma área de aproximadamente 200 ha, onde são realizadas atividades de campo, como manejos reprodutivos e manejos de ordenha.

Entre as principais atividades realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado destacam-se as pesquisas relacionadas à produção *in vitro* de embriões de bovinos e ovinos e atividades de capacitação de técnicos que atuam nesta área da reprodução animal, como cursos e dias de campo. A equipe de funcionários é composta por um laboratorista com formação em Técnico em Química, uma estudante da graduação do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), duas estudantes de pós-graduação em mestrado com formação em Medicina Veterinária, um estudante de pós-

graduação em doutorado com formação em Zootecnia e uma estudante de pós-graduação em pós-doutorado com formação em Medicina Veterinária.

A realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária na Embrapa Clima Temperado teve como principal objetivo aperfeiçoar os conhecimentos que envolvem a área da Reprodução Animal, bem como construir novas vivências, auxiliando na formação do caráter profissional e maximizar os conhecimentos práticos e teóricos ministrados durante a graduação.

2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As principais atividades desenvolvidas durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária foram direcionadas para produção *in vitro* de embriões bovinos e ovinos que abrange todo o processo de maturação *in vitro*, fecundação *in vitro*, cultivo *in vitro* e avaliação do desenvolvimento embrionário. Além disso, foram desenvolvidas atividades relacionadas à manutenção do laboratório, tais como a limpeza e esterilização de materiais utilizados na técnica de produção *in vitro*. Também foram realizadas atividades tais como reuniões, cursos e dia de campo, disponibilizados pela Embrapa. As atividades desenvolvidas no Laboratório de Reprodução Animal que envolve a técnica de produção *in vitro* de embriões estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Atividades laboratoriais acompanhadas durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária, realizado na Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, no período de 24 de julho a 25 de agosto de 2017.

Atividades Desenvolvidas	Espécie	Número de Rotinas	%
Limpeza e esterilização de materiais do laboratório	-	25	14,52
Troca de 70% do meio de cultivo (<i>Feeding</i>)	Bovino	20	11,62
Avaliação da clivagem de embriões	Bovino	13	7,56
Preparação de solução salina para transporte de ovários	Bovino	12	6,98
Aspiração folicular <i>in vitro</i> de oócitos	Bovino	12	6,98
Preparação de meio de cultivo	Bovino	12	6,98
Cultivo <i>in vitro</i> de oócitos	Bovino	12	6,98
Preparação de meio de fecundação	Bovino	12	6,98
Fecundação <i>in vitro</i> de oócitos	Bovino	12	6,98
Avaliação do desenvolvimento embrionário	Bovino	12	6,98
Preparação de meio de maturação	Bovino	11	6,40
Maturação <i>in vitro</i> de oócitos	Bovino	11	6,40
Preparação de meio de maturação	Ovino	1	0,58
Maturação <i>in vitro</i> de oócitos	Ovino	1	0,58
Preparação de meio de fecundação	Ovino	1	0,58
Fecundação <i>in vitro</i> de oócitos	Ovino	1	0,58
Preparação de meio de cultivo	Ovino	1	0,58
Cultivo <i>in vitro</i> de oócitos	Ovino	1	0,58
Avaliação da clivagem de embriões	Ovino	1	0,58
Avaliação do desenvolvimento embrionário	Ovino	1	0,58
Total		172	100

As atividades desenvolvidas na área de clínica, na Embrapa Clima Temperado, estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividades Clínicas e Reprodutivas acompanhadas durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária, realizado na Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, no período de 24 de julho a 25 de agosto de 2017.

Atividades	Espécie	Número	%
Diagnóstico de gestação por ultrassonografia	Bovino	110	38,60
Avaliação ginecológica por ultrassonografia	Bovino	47	16,50
Protocolos de inseminação artificial em tempo fixo	Bovino	40	14,04
Avaliação de escore de condição corporal	Bovino	35	12,28
Coleta de sêmen	Ovino	12	4,21
Diagnóstico de gestação por ultrassonografia	Ovino	8	2,81
Tosa higiênica	Ovino	7	2,46
Seleção de receptoras para transferência de embriões	Bovino	6	2,10
Protocolos de sincronização para transferência de embriões em tempo fixo	Bovino	6	2,10
Transferência de embriões	Bovino	5	1,75
Protocolos de superovulação	Bovino	2	0,70
Orquiectomia bilateral	Bovino	2	0,70
Coleta de embriões	Bovino	1	0,35
Exame andrológico	Bovino	1	0,35
Descorna térmica	Ovino	1	0,35
Casqueamento corretivo	Ovino	1	0,35
Coleta de sangue	Ovino	1	0,35
Total		285	100

As atividades complementares realizadas na Embrapa Clima Temperado, como participação em reuniões, palestras e cursos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Atividades complementares acompanhadas durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária, realizado na Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, no período de 24 de julho a 25 de agosto de 2017.

Atividades	Número	%
Participação como ouvinte em aula de mestrado	2	25,00
Participação em reuniões do laboratório	2	25,00
Participação em reunião dos estagiários	1	12,50
Seminário de biossegurança na cadeia produtiva do leite	1	12,50
Participação em dia de campo	1	12,50
Minicurso de inseminação artificial em tempo fixo	1	12,50
Total	8	100

Durante o desenvolvimento do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa também foram acompanhados três projetos de pesquisa, sendo o primeiro projeto intitulado como “Relação entre o diâmetro folicular e o momento da ovulação: aplicação da inseminação artificial em tempo fixo (IATF)

em blocos para aumento da taxa de prenhez em bovinos”, este experimento é pertencente a dissertação de mestrado da aluna Bruna Mion do curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFPel. No segundo projeto intitulado como “Avaliação da prevalência e dos fatores de risco das principais doenças da reprodução em bovinos de leite de diferentes regiões do Rio Grande do Sul”, foi acompanhado uma parte pertencente a dissertação de mestrado da aluna Janaína Fadrique da Silva do curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFPel. E o terceiro projeto é pertencente a tese de doutorado do aluno Joao Alvarado Rincón do curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFPel, intitulado como “Efeitos da lipoproteína de alta densidade sobre a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário *in vitro* em bovinos”.

A limpeza e esterilização de materiais no Laboratório de Reprodução da Embrapa Clima Temperado seguiam rigidamente as normas básicas de segurança e limpeza dos materiais. A lavagem dos materiais utilizados para a produção *in vitro* de embriões era realizada com o produto Extran[®] e para evitar contaminações por microorganismos que pudessem vir a prejudicar o desenvolvimento embrionário realizava-se a esterilização destes materiais conforme a categoria, através da autoclave, estufa ou por exposição a luz ultravioleta (UV). Para a limpeza de bancadas presentes no laboratório utilizava-se o álcool 70% e para a limpeza do chão da sala de cultivo era utilizada a solução desinfetante Letah Max[®] a cada sete dias.

Para acessar a sala de limpeza e esterilização de materiais e a sala de preparação de meios e armazenagens de reagentes preconizava-se o uso de jaleco e sandálias crocs e antes de quaisquer tipos de procedimento as mãos deviam ser higienizadas com sabonete desinfetante. Para permanência na sala de cultivo dos embriões era preconizado o uso de avental específico, touca e máscara, e recomendado o uso de solução antisséptica nas mãos antes de acessar o fluxo laminar para manipulação com os materiais.

3 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Ronaldo Junior da Silva, Denize da Rosa Fraga, Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro

3.1 INTRODUÇÃO

A reprodução animal é um fator importante que quando bem manejada na propriedade rural está ligada a eficiência e a rentabilidade dos sistemas de produção (NEVES et al., 2010). Portanto, para Vieira (2012) o emprego de biotecnologias reprodutivas favorece o aumento dos índices reprodutivos dos animais. Atualmente no mercado há várias biotécnicas que podem ser empregadas com este intuito, como a inseminação artificial (IA), superovulação e transferência de embriões, criopreservação de gametas e embriões, sexagem espermática e embrionária, produção *in vitro* de embriões (PIV), clonagem por transferência nuclear de células embrionárias ou somáticas, transgenia e a biologia com células tronco. Essas técnicas proporcionam o desenvolvimento científico mundial, sendo que o Brasil é um país referência na PIV.

A PIV é uma biotécnica reprodutiva que surgiu e se consolidou no Brasil para auxiliar no desenvolvimento do melhoramento animal. Nos últimos 40 anos, o progresso ocorrido com a utilização desta biotécnica causou um considerável impacto no setor econômico brasileiro, demonstrando assim, que o seu uso não é dependente apenas da eficiência em sua utilização, mas também dos fatores econômicos do mercado que esta biotécnica utiliza e consegue gerar, promovendo assim, o avanço de outras tecnologias (LIMA et al., 2014). Viana et al. (2017) ressalta que apesar da falta de estudos direcionados a avaliação dos aspectos econômicos com a PIV no Brasil, a quantidade de embriões que são produzidos atualmente impactam na ampliação do uso de tecnologias *in vitro*, estimulando as empresas responsáveis pela produção embriões a investirem neste setor.

A manipulação dos gametas em condições laboratoriais (*in vitro*) caracteriza a PIV, simulando os processos fisiológicos naturalmente desenvolvidos nas fêmeas *in vivo* (SCANAVEZ et al., 2013). Sendo esta uma biotecnologia reprodutiva importante que pode ser utilizada em mamíferos domésticos de interesse econômico. Esta biotécnica tem como principal objetivo a obtenção de embriões viáveis a partir de fêmeas saudáveis podendo assim, ser empregada como alternativa para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir que ocorra o descarte involuntário e precoce de fêmeas de alto valor genético ou portadoras de alguma alteração adquirida que prejudique a reprodução de forma

natural, por meio de técnicas convencionais ou via transferência de embriões (TE) (GONÇALVES et al., 2007; MELLO et al., 2016).

Para Scanavez et al. (2013) uma das principais vantagens com o uso da PIV é o aumento significativo no número de crias produzidas por fêmea. Além disso, fêmeas a partir dos seis meses de idade, gestantes até o terceiro mês ou em período pós-parto podem ser utilizadas como doadoras de oócitos em programas de PIV. Quando utilizada a técnica da coleta de oócitos guiada por ultrassom (OPU) tem-se a vantagem da não utilização de hormônios para a recuperação de oócitos, aumentando desta forma a vida reprodutiva das doadoras e reduzindo o intervalo de produção dos embriões (MELLO et al., 2016).

Apesar dos avanços obtidos nos últimos anos com a PIV, a sua utilização ainda é bastante limitada pela grande inconsistência dos resultados, sendo que, os índices de zigotos que atingem os estágios de blastocistos ainda são inferiores aos resultados esperados, variando entre 20-50% e com taxas de gestação em torno de 40%. Essa menor eficiência pode ser decorrente da qualidade inferior dos embriões produzidos *in vitro*, em comparação com os embriões produzidos *in vivo*, levando a uma diminuição dos resultados obtidos (GONÇALVES et al., 2008b; NEVES et al., 2010).

Scanavez et al. (2013) ainda ressalva que o uso da PIV em larga escala ainda é bastante restrito devido ao seu alto custo operacional e ao tempo requerido para a rotina de produção, além de se fazer necessária a monitoração rigorosa das doadoras, receptoras e embriões para assegurar a eficiência no uso da técnica. Fatores como a taxa de perdas embrionárias precoces ou tardias e o nascimentos de conceptos relativamente grandes, também devem ser levados em consideração no uso da PIV, já que estes representam elevados riscos à rentabilidade da biotécnica.

O objetivo deste relatório é descrever as atividades de PIV de embriões bovinos acompanhadas durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária, realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, comparando a literatura.

3.2 DESENVOLVIMENTO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotecnologia reprodutiva importante que vem apresentando consideráveis avanços e está sendo incorporada a diversos sistemas de produção animal (RUMPF, 2007).

Durante o período de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária, realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado foi possível acompanhar todas as etapas que envolviam e eram direcionadas ao processo da PIV. Sendo que o laboratório trabalha nesta linha de pesquisa há aproximadamente 20 anos. O processo de PIV envolve as etapas de coleta dos oócitos, a maturação de oócitos *in vitro* (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo embrionário *in vitro* (CIV) até as fases de mórula e blastocistos, que é quando os embriões poderão ser transferidos para as receptoras ou criopreservados (PESSOA et al., 2010; VARAGO et al., 2008). Estas etapas que envolvem o processo da PIV de embriões bovinos e que são realizadas no Laboratório de Reprodução Animal serão descritas a seguir:

3.2.1 Transporte e aspiração folicular de ovários

Para a técnica de produção *in vitro* de embriões, os ovários utilizados para a realização da aspiração folicular eram oriundos de abatedouros locais, transportados através de recipientes térmicos contendo solução salina (NaCl a 0,9%) aquecida a uma temperatura de 32-35°C e suplementada com antimicrobiano gentamicina na dose de 1,1 mg/mL até o Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado. Ao chegar ao laboratório, os ovários eram contabilizados e lavados novamente com solução salina com gentamicina equivalente a 1,1mg/mL previamente aquecida a 32-35°C. Após este procedimento de lavagem, os ovários eram colocados em recipientes de vidro estéreis, contendo solução salina (NaCl a 0,9%) aquecida a 32-35°C e antibiótico gentamicina (1,1 mg/mL), mantendo o recipiente em banho-maria durante todo o processo de aspiração folicular dos ovários.

Para Mariano et al. (2015) o transporte de ovários do abatedouro até o laboratório deve ser realizado em uma temperatura entre 35-37°C. A temperatura utilizada para o transporte dos ovários pelo Laboratório de Reprodução da Embrapa varia de 32-35°C, diferindo assim da literatura utilizada.

O transporte de ovários do abatedouro até o laboratório deve ser realizado em solução salina tamponada fosfatada (PBS) ou através de solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% na

presença de antimicrobianos (MARIANO et al., 2015). Palma (2008) destaca que a adição de antimicrobiano juntamente a solução salina de transporte dos ovários serve para melhorar as condições de higiene e diminuir o risco de contaminação dos ovários. No laboratório a solução de NaCl a 0,9% era utilizada juntamente com a adição do antimicrobiano gentamicina para o transporte dos ovários, corroborando desta forma com a literatura.

No laboratório, segundo Gonçalves et al. (2008a) os ovários são lavados novamente com nova solução salina aquecida na mesma temperatura de transporte contendo os antimicrobianos penicilina e estreptomicina, o que difere do procedimento realizado no Laboratório de Reprodução da Embrapa, onde o mesmo utiliza como protocolo apenas o uso de antimicrobiano a base de gentamicina.

A coleta de oócitos para a PIV pode ser realizada através de diversas técnicas, sendo *post mortem*, a partir da punção folicular de ovários obtidos através de abatedouros, ou *in vivo* por meio da laparotomia ou de laparoscopia via flanco, e ainda por laparoscopia vaginal ou através da técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom – *Ovum Pick Up* (OPU) (MELLO et al., 2016; VARAGO et al., 2008). O Laboratório de Reprodução possui como finalidade a pesquisa e utiliza ovários provenientes de abatedouros, sendo que Gonçalves et al. (2007) destaca que a obtenção de oócitos a partir de ovários advindos de abatedouros é uma ferramenta extremamente importante para utilização a fins de pesquisa.

O procedimento de aspiração folicular dos ovários (Anexo C) era realizado através de uma bomba de vácuo digital (Anexo D) contendo duas mangueiras de silicone acopladas a dois tubos Falcon[®] de 15 mL e dois escalpes de calibre 19 G. Durante o processo de aspiração dos ovários, a bomba de vácuo era mantida em uma pressão de 10-12 milímetros de mercúrio (mmHg). Preconizava-se ligar a bomba de vácuo com uma hora de antecedência do processo de aspiração, para que houvesse a estabilização da temperatura entre 32-35°C no interior dos tubos Falcons[®] onde o conteúdo aspirado era depositado. Um dos métodos mais simples utilizados para a aspiração dos oócitos é realizado através de uma bomba de vácuo acoplada a uma agulha em que os calibres variam de 18 G a 21 G (PALMA, 2008). Outro fator importante a ser levado em consideração no laboratório era para que a agulha utilizada para a punção estivesse absolutamente afiada, portanto era preconizada a troca do escalpe a cada 20-30 ovários puncionados para melhorar taxa de recuperação de oócitos. Este tipo de metodologia utilizada é extremamente eficiente, pois proporciona uma recuperação de oócitos de boa morfologia para a realização de estudos *in vitro* (GONÇALVES et al., 2007).

Durante a aspiração, era tomado o cuidado para não puncionar os folículos dominantes presentes nos ovários, sendo recomendada somente a aspiração de folículos entre 2 a 8

milímetros (mm), pois folículos superiores a este tamanho, já poderiam se encontrar em processo de maturação, o que seria indesejado para as rotinas da produção *in vitro* de embriões. Para Gonçalves et al. (2008a) os oócitos que são utilizados na PIV são provenientes de folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm, pois oócitos presentes em folículos menores do que 2 mm de diâmetro normalmente não são competentes a iniciarem o processo de meiose e oócitos presentes em folículos maiores de 8 mm geralmente encontra-se em processo de atresia ou em processo de maturação, demonstrando assim que em ambos os casos a viabilidade é comprometida.

O processo de aspiração folicular dos ovários era realizado cuidadosamente através da introdução da agulha pelo parênquima do ovário, evitando puncionar diretamente o folículo, para que não houvesse o extravasamento do líquido folicular e a perda dos oócitos. Além disso, era necessário tomar cuidado ao puncionar folículos próximos a algum corpo lúteo que pudesse estar presente, pois como os corpos lúteos são muito vascularizados, o sangue poderia ser aspirado, prejudicando a busca e seleção dos oócitos. É válido ressaltar que a taxa de recuperação de oócitos também é dependente da prática do técnico ao executar o procedimento, da condição fisiológica do animal e dos equipamentos utilizados e sua aferição. A eficiência da aspiração folicular de oócitos depende do número de oócitos recuperados conforme o número de folículos aspirados, variando de acordo com o tamanho de cada ovário e a prática do técnico na execução do procedimento (PALMA, 2008).

3.2.2 Procura e seleção de oócitos

Após o processo de aspiração dos ovários era aguardado em torno de 10 minutos de repouso para a sedimentação dos oócitos no tubo Falcon[®], dessa forma, ocorrendo a formação de um pellet no interior do tubo, composto por oócitos e células de descamação da parede dos folículos. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, o pellet era removido do interior do tubo e colocado em uma placa de Petri[®] contendo fluido folicular e, posteriormente, era procedida a seleção dos oócitos através de estereomicroscópio sob aumento de 40 vezes (Anexo E). Este mesmo processo é descrito por Palma (2008), onde o mesmo cita que deve ser aguardado um período em torno de 10 minutos para que ocorra a decantação e a formação do pellet e após com o auxílio de uma pipeta Pasteur o mesmo é removido e depositado em uma placa de Petri para realizar-se o processo de seleção dos oócitos.

A seleção dos oócitos era realizada conforme a sua qualidade, homogeneidade do citoplasma e quantidade de células do *cumulus oophorus* presente. A medida que os oócitos

viáveis fossem sendo selecionados, os mesmos eram sendo colocados em outra placa Petri[®] com líquido folicular centrifugado e posteriormente passados para o meio de lavagem contendo de 2-3 gotas de 50 microlitros (μL) cada uma para a remoção dos debris celulares e células de descamação ainda presentes nos oócitos selecionados. Após esta lavagem, os mesmos eram colocados em contato com o meio de maturação em outra placa Petri[®] para uma lavagem final. Após o processo de lavagem no meio de maturação, os oócitos eram transferidos para placas Nunc[®] de quatro poços contendo 400 μL de meio de maturação previamente preparado e estabilizado.

Na prática, o potencial de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário é estimado a partir da aparência da células do *cumulus oophorus*. Oócitos com maior potencial de viabilidade devem apresentar o citoplasma homogêneo e várias camadas de células do *cumulus oophorus* presentes de forma compacta (GONÇALVES et al., 2008a), corroborando com os critérios de seleção utilizados pelo laboratório.

3.2.3 Maturação *in vitro* de oócitos

O processo de maturação envolve uma série de mudanças no citoplasma e no núcleo do oócito para que este possa ser fecundado e desenvolver-se até o estágio de blastocisto (MELLO et al., 2016). A eficiência das tecnologias utilizadas na maturação *in vitro* de oócitos muitas vezes é limitada pela competência de desenvolvimento do oócito, que se refere ao estado bioquímico e molecular que permite que um oócito seja fecundado e desenvolva o embrião (GILCHRIST e THOMPSON, 2007). Esta fase é considerada uma das mais importantes na PIV, pois é nesta fase que o oócito consegue adquirir capacidade para prosseguir nos próximos eventos da PIV (GOTTARDI e MINGOTI, 2009), portanto para Gilchrist e Thompson (2007) destacam que um dos maiores desafios no campo da biologia reprodutiva é entender a competência de desenvolvimento do oócito, incluindo o ambiente folicular ovariano e seu progresso em relação ao potencial de desenvolvimento do oócito.

Durante todo o processo de desenvolvimento o oócito encontra-se no estágio de diplóteno da prófase I ou estágio de vesícula germinativa até se comprometerem a ovulação ou a atresia (LONERGAN e FAIR, 2016; MELLO et al., 2016). O reinício da meiose ou maturação nuclear *in vivo* acontece após o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) durante o estro, fato este que ocorreria naturalmente através da ovulação. *In vitro*, a retirada do oócito através do contato com as células foliculares é um dos fatores primordiais para que aconteça o processo de maturação nuclear. Com isto, a maturação nuclear do oócito

compreende a progressão da fase de diplóteno da prófase até a fase de metáfase II (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008). Em termos de eficiência, aproximadamente 90% dos oócitos imaturos passam pelo processo de maturação nuclear e progride da prófase I para a metáfase II, estágio este que seriam ovulados *in vivo* (LONERGAN e FAIR, 2016). Além da maturação nuclear, se faz necessário que os oócitos adquiram durante a fase de crescimento folicular, a capacidade para completar a sua maturação citoplasmática no processo de desenvolvimento embrionário. A maturação citoplasmática são modificações ultra-estruturais, moleculares e bioquímicas no citoplasma e na membrana plasmática do oócito, possibilitando que o mesmo tenha competência para realizar seu desenvolvimento e o mecanismo enzimático relacionado ao bloqueio da polispermia (MELLO et al., 2016).

Para o processo de maturação *in vitro* dos oócitos era necessário que houvesse a preparação do meio de maturação nas placas Nunc[®], deixando-o *overnight* com pelo menos duas horas de antecedência, com o intuito de estabilizar a temperatura e o pH do meio de maturação. O meio de maturação utilizado pelo laboratório de reprodução era comercial (Gibco[®] a base de TCM 199), suplementado com soro fetal bovino (SFB), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), piruvato, amicacina, penicilina e estreptomicina. O tipo de suplementação utilizada pelo Laboratório está de acordo com a utilizada por Gonçalves et al. (2007) onde o mesmo ressalva que o meio pode ser suplementado com SFB, hormônios como FSH e LH, piruvato e antimicrobianos. Este mesmo autor cita que o Tissue Culture Medium (TCM 199[®]) é o meio mais utilizado entre os laboratórios que trabalham com a PIV. A adição de hormônios como o FSH e LH juntamente ao meio de maturação proporciona um aumento na capacidade de fecundação dos oócitos e melhora posteriormente o desenvolvimento embrionário.

Já o soro fetal é um material de origem biológica que possui vários nutrientes, podendo ser utilizado tanto no processo de maturação *in vitro* quanto no cultivo embrionário (MOZZAQUATRO et al., 2004). No processo de maturação *in vitro* dos oócitos possui o intuito de promover a expansão das células do *cumulus* e a maturação do oócito (GONÇALVES et al., 2008a). No laboratório é utilizado o SFB (Vitrocell[®]) no meio de maturação, porém há estudos de que outros tipos de soros podem ser utilizados na maturação *in vitro* de oócitos, como por exemplo, o soro de égua em estro ou o de vaca em estro.

Em um estudo realizado por Mozzaquatro et al. (2004) demonstraram que o soro de égua em estro na maturação e no cultivo resulta em taxas de blastocistos similares em comparação a utilização de soro de vaca em estro. Porém em outro estudo realizado por

Figueiró et al. (2004) foi avaliado a eficiência destes soros em relação a suplementação com LH ou FSH na PIV, em conclusão este estudo demonstrou que quando se utiliza o soro de égua em estro na maturação *in vitro* não há necessidade da adição de LH e FSH, porém quando utilizado o soro de vaca em estro estes hormônios devem ser adicionados no meio. A utilização do soro de égua em estro não descarta as funções dos hormônios LH e FSH, mas pode entrar como uma alternativa para reduzir os custos com utilização de hormônios na PIV de embriões bovinos.

No laboratório era estabelecido um padrão em que quando houvesse um grande número de oócitos (50 oócitos) por gotas de maturação, as gotas deveriam ser de 400 μL de meio de maturação. Quando o número de oócitos fosse reduzido, as gotas deveriam ser de 100 μL de meio de maturação. Os oócitos permaneciam no meio de maturação em uma estufa (Anexo F), com temperatura de 39°C e atmosfera gasosa controlada, com 5% de gás carbônico (CO_2) em ar e umidade saturados. O período de maturação era variável, em geral de 22 a 24 horas. Além do meio de maturação, é necessário uma estufa que conserve a temperatura e atmosfera gasosa controlada, o período de maturação é variável, em geral de 22 a 24 horas em atmosfera controlada com 5% de CO_2 em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2008a), estando de acordo com o procedimento realizado no Laboratório de Reprodução da Embrapa.

3.2.4 Fecundação *in vitro* de oócitos

O processo de expansão no uso comercial da fecundação *in vitro* e as suas consequentes implicações no mercado de embriões bovinos no Brasil, tornou-se um fator importante para demonstrar as potencialidade e limitações da PIV. A eficiência e a viabilidade econômica da fecundação *in vitro* estão relacionadas ao número de folículos aspirados dos ovários e a qualidade do potencial de desenvolvimento dos oócitos que são recuperados (SIQUEIRA et al., 2012).

A fecundação consiste no processo em que o espermatozóide entra em contato com o oócito, dando origem ao zigoto, que, posteriormente, se desenvolve até a fase de blastocisto (MELLO et al., 2016). Para Palma (2008) as células espermáticas devem alcançar a capacidade fecundante. No processo *in vivo* os espermatozoides precisam chegar até a ampola da tuba uterina para fecundar o oócito, durante este trajeto, substâncias presentes no sistema reprodutor da fêmea como os glicosaminoglicanos, induzem a capacitação dos espermatozoides, onde este processo reflete na desestabilização da membrana plasmática pela

remoção de algumas proteínas e modificações bioquímicas que levam a hiperativação espermática. Assim, desta forma, este processo torna possível a ligação da membrana do espermatozóide aos receptores específicos na zona pelúcida do oócito, onde acontece a reação acrossômica (GONÇALVES et al., 2007; MELLO et al., 2016).

Gonçalves et al. (2007) ainda destaca que para que o processo *in vitro* seja bem sucedido, os meios devem fornecer um ambiente adequado. Este ambiente *in vitro* deve proporcionar o metabolismo dos oócitos e células do *cumulus* para manter a função espermática eficiente (GONÇALVES et al., 2008a). No processo de fecundação *in vitro*, os oócitos presentes no meio de maturação eram retirados e colocados em outra placa Nunc[®] contendo meio base Fert-TALP[®], suplementado com albumina sérica bovina (BSA), piruvato, penincilamina, hipotaurina e epinefrina (PHE) e substâncias capacitantes tal como a heparina ao meio base.

O processo de capacitação é compreendido por uma desestabilização na membrana plasmática onde são observadas mudanças bioquímicas, como alterações na fluidez e no teor lipídico, resultando no processo de hiperativação dos espermatozoides. Neste processo é possível a ligação do espermatozóide a receptores específicos na zona pelúcida do oócito, onde ocorre a reação acrossômica (GONÇALVES et al., 2008, MELLO et al., 2016).

O meio de fecundação *in vitro* mais utilizado pelos laboratórios é o Fert-TALP[®], que em sua composição contém a heparina, fator importante para promover a capacitação dos espermatozoides (GONÇALVES et al., 2007; MELLO et al., 2016). A adição de PHE ao meio Fert-TALP[®] tem como finalidade aumentar a atividade espermática e facilitar a sua penetração, aumentando assim os índices de fecundação (GONÇALVES et al., 2008a).

No processo de fecundação *in vitro* também era preconizado o volume das gotas do meio de fecundação (400 ou 100 μ L) de acordo com o número de oócitos. Depois de adicionado o meio de fecundação na placa Nunc[®], o mesmo permanecia na estufa para que houvesse a estabilização do meio até o momento da fecundação, por duas horas. No laboratório era preconizado realizar a transferência dos oócitos para a gota contendo o meio de fecundação o mais breve possível, para que não ocorressem variações de temperatura e mudanças no pH do meio.

O período de co-cultivo (espermatozóide e oócito) era realizado por um período de 18 a 22 horas, em temperatura e atmosfera controlada, sob as mesmas condições da MIV, corroborando com Mello et al. (2016) onde o mesmo ressalva que o período de co-cultivo é realizado por um período de 18-22 horas em temperatura de 39°C e atmosfera com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

3.2.5 Preparação do sêmen

O sêmen utilizado pelo laboratório para a fecundação dos oócitos era comercial. A palheta do sêmen escolhida para a fecundação era descongelada 10 segundos no ar e após em banho-maria a uma temperatura de 35°C por 30 segundos. O descongelamento era realizado de forma cuidadosa para evitar que não houvesse nenhum tipo de alteração no sêmen que viesse a prejudicar o processo de fecundação dos oócitos. Após o processo de descongelamento, a palheta era seca com gaze esterilizada e o conteúdo era depositado em um eppendorf.

Uma alíquota do sêmen era retirada e eram avaliados motilidade e vigor através de um microscópio óptico sobre lâmina e lamínula previamente aquecidas. A análise do sêmen se faz muito importante para predizer o potencial de fertilidade agregado às amostras seminais, a avaliação do sêmen em diversas espécies é baseado através de técnicas de microscopia, tendo como principais parâmetros avaliados na amostra seminal, a motilidade, vigor, morfologia e concentração espermática (FREITAS-DELL'AQUA et al., 2009).

No Laboratório de Reprodução da Embrapa a motilidade e vigor eram avaliados antes do processo de seleção espermática. Após o processo de seleção espermática era realizado novamente a análise de motilidade, vigor e também o cálculo de concentração. A motilidade é definida como uma avaliação subjetiva, expressada pelo percentual de espermatozóides móveis. O vigor é representado pela intensidade com que os espermatozóides se movimentam, esta característica é classificada de 0 a 5, onde 0 representa a ausência de movimento progressivo com fraco deslocamento da cauda do espermatozóide e 5 é representado como o vigor máximo (FOLHADELLA, 2008).

3.2.6 Preparação do gradiente de Percoll®

Para a fecundação é necessário que os espermatozóides vivos sejam separados dos demais componentes do sêmen e crioprotetores. A técnica ideal para a separação espermática deve ser rápida, simples e de baixo custo, capaz de recuperar a maioria dos espermatozóides móveis e não resultar em alterações espermáticas, permitindo assim o controle da concentração e volume final da suspensão espermática (GONÇALVES et al. 2008a).

O gradiente de Percoll® era a forma de seleção espermática utilizada pelo Laboratório de Reprodução. O Percoll® é uma solução sílica coloidal onde os espermatozóides são selecionados conforme a sua motilidade (PALMA, 2008). Esse método de seleção era

realizado através da utilização de duas concentrações diferentes do gradiente de Percoll[®], uma concentração de 45% e outra de 90%. Para a preparação do gradiente utilizava-se um eppendorf de 2 mL, onde primeiramente era adicionado o Percoll[®] 90% no volume de 400 µL e em seguida sobreposto a este era adicionado lentamente o Percoll[®] 45% no volume de 400 µL, cuidando para que não houvesse a mistura entre os dois gradientes. Estes mesmos tipos de concentrações utilizadas e forma de preparo são descritos por Gonçalves et al. (2008a), onde o mesmo destaca que estas duas concentrações de Percoll[®] são necessárias para formar o gradiente de separação espermática.

A técnica do gradiente de Percoll[®] demonstra-se eficaz na seleção espermática e, além disso, resulta em frações límpidas com espermatozoides de elevada motilidade, não gera lesões na cromatina, elimina leucócitos e proporciona uma boa recuperação de gametas, mesmo em amostras com baixas concentrações espermáticas (ZÚCCARI et al., 2008). No Laboratório de Reprodução da Embrapa a preparação do gradiente se dava com duas horas de antecedência da fecundação para que houvesse a estabilização do mesmo. Em seu estudo Zúccari et al. (2008) concluem que a passagem dos espermatozoides pelo gradiente de Percoll[®] demonstrou-se eficaz na seleção espermática, proporcionando uma maior população de espermatozoides móveis, com membranas plasmática e acrossomal íntegras, não causando alterações na condensação da cromatina nuclear.

3.2.7 Seleção e avaliação da concentração espermática

Como no laboratório o método utilizado para a seleção espermática se dava através do gradiente de Percoll[®], após o descongelamento do sêmen e a avaliação da motilidade e vigor, o mesmo era depositado na porção superficial do gradiente. Após este procedimento, o eppendorf passava por um processo de centrifugação de 700 giros por um período de cinco minutos. Posteriormente ao processo de centrifugação, o sobrenadante presente no eppendorf era removido e o pellet formado ressuspenso em meio de capacitação espermática Sperm-TALP[®] e novamente centrifugado a 700 giros por cinco minutos. Este mesmo processo de centrifugação e meio capacitante utilizado é citado por Gonçalves et al. (2008a), diferindo apenas no tempo utilizado para a centrifugação, onde o autor cita um período de trinta minutos. O sobrenadante presente no eppendorf era removido novamente, restando somente o pellet, onde retirava-se uma alíquota para avaliação em microscópio óptico dos parâmetros espermáticos, sendo eles, a motilidade, vigor e a concentração espermática da amostra para o cálculo da dose inseminante.

Através da câmara de Neubauer era procedida a avaliação da concentração espermática (Anexo G), através da contagem de espermatozóides, utilizada para a realização do cálculo da dose inseminante. A concentração espermática era expressa mediante a seguinte equação, $V_i = C_f \times V_f / C_i$ onde que:

V_i , expressa a dose inseminante.

C_f , significa 1×10^6 espermatozóides por mL.

V_f , refere-se ao volume da gota de fecundação.

C_i , refere-se a concentração encontrada na câmara de Neubauer.

Após a separação, os espermatozóides viáveis são diluídos em uma concentração final de 1 a 5×10^6 espermatozóides por mililitros (mL) de meio (GONÇALVES et al., 2007). No Laboratório de Reprodução da Embrapa a concentração espermática utilizada para a fecundação dos oócitos era de 1×10^6 por mL de meio, o volume da dose inseminante era calculado conforme a motilidade expressa na avaliação seminal e a concentração da fração viva de espermatozóides obtida após a capacitação espermática.

3.2.8 Cultivo *in vitro* de embriões

O cultivo *in vitro* é considerado a fase em que ocorrem alguns eventos significativos, como a ativação do genoma embrionário, divisão iniciação e continuação da clivagem (divisão celular), agregação e compactação dos blastômeros, início da diferenciação do trofoblasto e embrioblasto, desenvolvimento da blastocle e rompimento da zona pelúcida (GONÇALVES et al., 2008a). A transcrição deficiente do genoma embrionário durante esta fase pode levar ao bloqueio do desenvolvimento em várias espécies, esta dificuldade contribuiu para o desenvolvimento de sistemas utilizados no cultivo embrionário (GONÇALVES et al., 2007).

Decorridas 18-22 horas ao processo de co-cultivo entre oócitos e espermatozóides, dava-se início ao processo de cultivo *in vitro* dos embriões, onde os prováveis zigotos eram removidos do meio de fertilização e submetidos ao processo de desnudamento e retirada dos espermatozóides. Esta etapa consistia em realizar-se sucessivas pipetagens na placa Nunc[®] e em seguida, a lavagem das estruturas em gotas de meio de cultivo para que ocorresse a remoção das células do *cumulus oophorus* e a retirada dos espermatozóides que ainda pudessem estar aderidos a zona pelúcida do oócito. Este mesmo processo é realizado por Sirard e Coenen (2006), onde antes da transferência dos prováveis zigotos para a placa de cultivo, os oócitos devem ser separados das células do *cumulus oophorus* através da

realização de sucessivas pipetagens e posteriormente lavados com o meio de cultivo, com o intuito de evitar a transferência das células do *cumulus* para o meio utilizado para o desenvolvimento embrionário.

Posteriormente a este procedimento, os prováveis zigotos eram transferidos à placa de cultivo, previamente preparada com duas horas de antecedência para a estabilização do meio, contendo 200 µL de meio de SOFaa[®] suplementado com piruvato e SFB. Corroborando com Palma (2008) onde o mesmo descreve o SOFaa[®] como um dos meios mais utilizados na atualidade, juntamente com adição do piruvato como fonte energética e fontes protéicas como o SFB.

Nesta etapa era preconizado que as gotas fossem cobertas com óleo mineral para auxiliar na estabilização do pH e evitar que houvesse evaporação do meio. Recomendava-se que todo este processo fosse realizado o mais breve possível, para que não houvesse mudanças de temperatura e no pH da gota. Os zigotos permaneciam na estufa de cultivo por sete dias, em temperatura e atmosfera controlada, sob as mesmas condições da MIV.

O tempo utilizado para o cultivo *in vitro* de embriões varia de 7 a 9 dias, a temperatura utilizada é de 39°C com atmosfera controlada de 5% de oxigênio (O₂), 5% de CO₂ e 90% de nitrogênio (N₂) e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2008a). No Laboratório de Reprodução difere apenas na composição da atmosfera controlada na estufa, onde era utilizado as mesmas condições da MIV. A avaliação da taxa de blastocistos, era realizada no 7º dia de cultivo *in vitro*.

3.2.9 Feeding

O *feeding* consistia na troca de 70% do meio de cultivo, com o objetivo de renovação do meio e também para o fornecimento de quantidade uniforme de nutrientes durante todo o período de cultivo para os prováveis zigotos. Este processo era efetuado no dia em que se procedia a avaliação da clivagem (dia 3) e no dia de avaliação das mórulas (dia 5) após o início do cultivo *in vitro*. Conforme Gonçalves et al. (2008a) o *feeding* é considerado o processo pelo qual o meio de cultivo *in vitro* é renovado, a troca pode ser realizada de forma parcial ou total em um intervalo de um ou dois dias para que mantenha o controle da osmolaridade e o pH do meio. Diferindo assim do Laboratório de Reprodução da Embrapa, onde o *feeding* era realizado juntamente no dia da clivagem e avaliação das mórulas.

3.3.0 Clivagem de embriões

No laboratório o processo de avaliação da taxa de clivagem (Anexo H) era realizado 72 horas após o início do período de cultivo. Realizava-se esta etapa de forma cuidadosa e rápida sem que houvesse manipulações de forma brusca e que não viessem a causar alguma alteração em relação às mudanças de pH, temperatura ou conseqüentemente lesões aos embriões, que implicasse em danos ao processo de desenvolvimento embrionário respectivamente. A avaliação da clivagem era realizada com o auxílio de estereomicroscópio, através da visualização das clivagens celulares do embrião, podendo ser encontrados embriões com duas até oito células. A clivagem é estabelecida por uma série de divisões mitóticas das quais os zigotos que possuem uma célula com grande volume se divide em várias células de menor tamanho, denominadas de blastômeros até que haja a formação do blastocisto (GONÇALVES et al., 2008a). No Laboratório de Reprodução da Embrapa o critério utilizado para a avaliação da clivagem era realizado mediante a visualização de zigotos com duas até oito células.

3.3.1 Avaliação do desenvolvimento embrionário

No laboratório, realizava-se avaliação do desenvolvimento embrionário (Anexo I) normalmente no sétimo dia da fase de cultivo embrionário, onde era possível visualizar as estruturas formadas conforme o período de desenvolvimento em que os embriões se encontravam. Para Gonçalves et al. (2008a) taxa de blastocistos geralmente avaliada no 7º dia de cultivo *in vitro*, sendo que estes blastocistos podem permanecer na estufa de cultivo até o 9º dia caso queira-se avaliar a taxa de eclosão *in vitro*, este autor ainda ressalta que a taxa de blastocistos é o parâmetro mais fidedigno para avaliar a eficiência no processo de PIV. A taxa de blastocistos atingida na PIV no laboratório gira em torno de 30%, corroborando desta forma com Gilbert et al., (2015) onde o mesmo indica que a porcentagem de oócitos que conseguem se desenvolver até a fase de blastocisto a partir de ovários providos de frigoríficos atinge um platô correspondente de 30 a 40%. Com o crescente aumento da PIV de embriões bovinos para uso comercial, conseqüentemente há uma maior necessidade em aumentar o foco na otimização da produção de blastocistos (STROEBECH et al., 2015), através da utilização de condições mais adequadas de ambiente, incluindo a composição e suplementação dos meios (GILBERT et al., 2015).

Os embriões eram classificados de acordo com os seguintes estágios de desenvolvimento embrionário: mórula, mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto em eclosão e blastocisto eclodido. Posteriormente a avaliação do estágio de desenvolvimento embrionário, realizava-se o cálculo da taxa de desenvolvimento global embrionário, que consistia na divisão do número de embriões produzidos pelo número de oócitos que foram colocados em cultivo.

A classificação dos embriões bovinos seguem conforme a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), de acordo com Stringfellow e Seidel (1998).

Mórula: os blastômeros ainda permanecem evidentes, não sendo possível determinar ainda o número exato de células. Massa celular ocupa maior parte do espaço dentro da zona pelúcida. Visível entre os dias 5,5 e 6,0 do cultivo *in vitro*.

Mórula compacta: a compactação torna a massa de celular coesa, impossibilitando a individualização dos blastômeros, causando retração do embrião á zona pelúcida. Ocorre a formação de junções de adesão e a oclusão entre as células, preparando o embrião para a formação da blastocele. Visível entre o dia 6,0 a 6,5 do cultivo *in vitro*.

Blastocisto inicial: os blastômeros desenvolvem um gradiente osmótico que atrai água para o espaço intracelular dando início a formação de uma cavidade denominada blastocele. Duas populações celulares distintas são formadas: o trofoblasto que reveste a blastocele, e a massa celular interna lateral a blastocele. Visível entre os dias 6,5 a 7,0 do cultivo *in vitro*.

Blastocisto: a blastocele aumenta seu tamanho, tornando-se maior que a massa celular interna e ocupando gradualmente todo o espaço perivitelínico. O trofoblasto sofre diferenciações morfológicas e funcionais associadas à captação de nutrientes. Visível entre os dias 7,0 e 7,5 do cultivo *in vitro*.

Blastocisto expandido: a expansão da blastocele causa aumento de tamanho do embrião e reduz a espessura da zona pelúcida. Ocorre maior desenvolvimento do trofoblasto, a massa de células interna é visível dependendo da posição do embrião. O rompimento da zona pelúcida caracteriza a eclosão. Visível entre os dias 7,5 e 8,0 do cultivo *in vitro*.

Blastocisto em eclosão: o embrião inicia o processo de saída da zona pelúcida. Visível entre os dias 7,0 e 7,5 do cultivo *in vitro*.

Blastocisto eclodido: o embrião está totalmente livre da membrana pelúcida, sendo ainda verificado a presença da blastocele. Visível entre os dias 7,0 e 7,5 do cultivo *in vitro*.

Posteriormente ao processo de cultivo *in vitro* e a avaliação do desenvolvimento embrionário realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa, os embriões eram colocados em Trizol[®] para futura avaliação da expressão gênica de um projeto de pesquisa. O

Trizol[®] é um reagente utilizado para o isolamento de Ácido Desoxirribonucleico (DNA), Ácido Ribonucleico (RNA) e proteínas de amostras de tecidos ou células de animais, plantas, bactérias, vírus e leveduras. Em um estudo realizado por Rincón et al. (2016) o uso deste reagente é descrito para a realização da avaliação da expressão gênica de embriões bovinos. Adona et al. (2016) em seu estudo demonstraram que a análise da expressão gênica de oócitos durante o processo de maturação *in vitro* serve como uma alternativa para identificar os principais genes e proteínas regulatórias envolvidas nesta etapa. Portanto o desenvolvimento destas metodologias moleculares, como a análise da expressão gênica serve como uma importante chave na determinação da competência oocitária (PEREIRA et al., 2016).

3.3 CONCLUSÃO

O Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado se destaca realizando as atividades relacionadas a PIV, uma biotecnologia reprodutiva que ao longo dos anos se tornou destaque no cenário brasileiro de reprodução animal, pois cada vez mais a utilização desta biotécnica está se difundindo como uma alternativa para incrementar no melhoramento genético e maximização da produção animal.

Há aproximadamente 20 anos o laboratório vem desenvolvendo pesquisas relacionadas a PIV, o que demonstra experiência e diversos avanços obtidos ao decorrer destes anos com a utilização desta biotécnica. Porém um dos fatores limitantes ainda encontrado pelo laboratório está relacionado com a taxa de embriões que conseguem se desenvolver até a fase de blastocisto que ainda é relativamente baixa, tornando-se assim essencialmente importante seguir desenvolvendo pesquisas relacionadas as etapas que envolvem este processo de PIV de embriões para consequentemente produzir elevadas taxas de embriões de qualidade.

3.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONA, P. R. et al. *In vitro* maturation alters gene expression in bovine oocytes. **Zygote**, v. 24, n. 5, p. 624-633, 2016.

FIGUEIRÓ, G. M. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos com soro de égua ou de vaca em estro com ou sem a adição de LH/FSH. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 479-484, 2004.

FOLHADELLA, I. M. Biotecnologia no touro. In: PALHANO, H. B. **Reprodução em Bovinos: Fisiopatologia, Terapêutica, Manejo e Biotecnologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2008, cap. 9. p. 167-177.

FREITAS DELL' AQUA et al. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 213-222, 2009.

GILBERT, I.; MACAULAY, A.; ROBERT, C. Competência no desenvolvimento oocitário e qualidade embrionária: melhorias e novas perspectivas. In: Anais da XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2008, Gramado/RS. **Anais...** Gramado/RS, 2015, p. 76-87.

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v. 67, p. 6-15, 2007.

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**. 3 ed. São Paulo: Rocca, 2008a, cap. 14, p. 261-290.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 11, suplemento 1, p. 135-138, 2008b.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 212-217, 2007.

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**, v. 33, n. 2, p. 82-94, 2009.

LIMA, J. M. P. et al. Progresso metodológico e sua influência na produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 3, p. 135-140, 2014.

LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of oocytes *in vitro*. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, n. 2, p. 55-68, 2016.

MARIANO, R. S. G. et al. Aspiração Folicular em Ruminantes – Revisão de Literatura. **Revista Investigação em Medicina Veterinária**, v. 14, n. 6, p. 46-53, 2015.

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

MOZZAQUATRO, F. D. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos em meio suplementados com fontes protéicas definidas e indefinidas. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 1, p. 101-106, 2004.

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, suplemento especial, p. 414-421, 2010.

PALMA, G. A. Producción *in vitro* de embriones bovinos. In: **___Biotecnología de la Reproducción**. 2 ed. Mar del Plata: el autor, 2008, p. 313-380.

- PEREIRA, E. C. M.; BORGES, A. M.; OBA, E. Maturação *in vitro* de oócitos bubalinos e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 2, p. 43-50, 2016.
- PESSOA, G. A. et al. Influence of climatic conditions on *in vitro* production of bovine embryos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1381-1387, 2010.
- RINCÓN, J. A. A. et al. Exogenous paraoxanase-1 during oocyte maturation improves bovine embryo development *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 5, p. 827- 830, 2016.
- RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, suplemento especial, p. 229-233, 2007.
- SCANAVEZ, A. L.; CAMPOS, C. C.; SANTOS, R. M. Taxa de prenhez e perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 3, p. 722-728, 2013.
- SIQUEIRA, L. G. B. et al. Fatores que afetam a eficiência da fertilização *in vitro* em bovinos. **Spermova**, v. 2, n. 1, p. 10-12, 2012.
- SIRARD, M. A.; COENEN, K. *In vitro* maturation and embryo production in cattle. **Methods in Molecular Biology**, v. 348, p. 35-42, 2006.
- STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. IETS, p. 112-113, Illinois, 1998.
- STROEBECH, L. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos: Reconsiderando o desenvolvimento oocitário e a aplicação da biologia de sistemas. In: Anais da XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2015, Gramado/RS. **Anais...** Gramado/RS, 2015, p. 148-156.
- VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.
- VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 476-481, 2017.
- VIEIRA, R. J. Biotécnicas aplicadas à reprodução bovina: generalidades. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 55-65, 2012.
- ZÚCCARI, C. E. S. N. et al. Seleção em gradientes de Percoll[®] sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção animal**, v. 9, n. 2, p. 358-366, 2008.

4 CONCLUSÃO

A realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária foi de extrema importância, pois possibilitou-me aprimorar os conhecimentos vivenciados ao longo da trajetória acadêmica, especialmente relacionados a área da Reprodução Animal, promovendo assim, o crescimento pessoal e profissional, instigando cada vez mais a busca pelo diferencial.

O estágio é o momento em que o aluno consegue colocar em prática todo o conhecimento teórico obtido ao longo da graduação, além de proporcionar a formação do caráter profissional frente a novos desafios, permite a troca de experiências e o conhecimento de diversas pessoas.

Durante o período de estágio realizado na Embrapa Clima Temperado levarei na bagagem da vida, a amizade de muitos profissionais em que tive o prazer de ter o contato e que certamente contribuíram na minha formação pessoal e profissional. O maior legado que levarei comigo como Médico Veterinário é de que jamais saberemos tudo, porém a busca pelo conhecimento e o diferencial faz superar nossos limites.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONA, P. R. et al. *In vitro* maturation alters gene expression in bovine oocytes. **Zygote**, v. 24, n. 5, p. 624-633, 2016.

FIGUEIRÓ, G. M. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos com soro de égua ou de vaca em estro com ou sem a adição de LH/FSH. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 479-484, 2004.

FOLHADELLA, I. M. Biotecnologia no touro. In: PALHANO, H. B. **Reprodução em Bovinos: Fisiopatologia, Terapêutica, Manejo e Biotecnologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2008, cap. 9. p. 167-177.

FREITAS DELL'AQUA et al. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 213-222, 2009.

GILBERT, I.; MACAULAY, A.; ROBERT, C. Competência no desenvolvimento oocitário e qualidade embrionária: melhorias e novas perspectivas. In: Anais da XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2008, Gramado/RS. **Anais...** Gramado/RS, 2015, p. 76-87.

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v. 67, p. 6-15, 2007.

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**. 3 ed. São Paulo: Rocca, 2008a, cap. 14, p. 261-290.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 11, suplemento 1, p. 135-138, 2008b.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 212-217, 2007.

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**, v. 33, n. 2, p. 82-94, 2009.

LIMA, J. M. P. et al. Progresso metodológico e sua influência na produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 3, p. 135-140, 2014.

LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of oocytes *in vitro*. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, n. 2, p. 55-68, 2016.

MARIANO, R. S. G. et al. Aspiração Folicular em Ruminantes – Revisão de Literatura. **Revista Investigação em Medicina Veterinária**, v. 14, n. 6, p. 46-53, 2015.

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

- MOZZAQUATRO, F. D. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos em meio suplementados com fontes protéicas definidas e indefinidas. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 1, p. 101-106, 2004.
- 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.
- PALMA, G. A. Producción *in vitro* de embriones bovinos. In: ___ **Biología de la Reproducción**. 2 ed. Mar del Plata: el autor, 2008, p. 313-380.
- PEREIRA, E. C. M.; BORGES, A. M.; OBA, E. Maturação *in vitro* de oócitos bubalinos e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, n. 2, p. 43-50, 2016.
- PESSOA, G. A. et al. Influence of climatic conditions on *in vitro* production of bovine embryos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1381-1387, 2010.
- RINCÓN, J. A. A. et al. Exogenous paraoxanase-1 during oocyte maturation improves bovine embryo development *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 5, p. 827- 830, 2016.
- RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, suplemento especial, p. 229-233, 2007.
- SCANAVEZ, A. L.; CAMPOS, C. C.; SANTOS, R. M. Taxa de prenhez e perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 3, p. 722-728, 2013.
- SIQUEIRA, L. G. B. et al. Fatores que afetam a eficiência da fertilização *in vitro* em bovinos. **Spermova**, v. 2, n. 1, p. 10-12, 2012.
- SIRARD, M. A.; COENEN, K. *In vitro* maturation and embryo production in cattle. **Methods in Molecular Biology**, v. 348, p. 35-42, 2006.
- STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. IETS, p. 112-113, Illinois, 1998.
- STROEBECH, L. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos: Reconsiderando o desenvolvimento oocitário e a aplicação da biologia de sistemas. In: Anais da XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2015, Gramado/RS. **Anais...** Gramado/RS, 2015, p. 148-156.
- VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.
- VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 476-481, 2017.

VIEIRA, R. J. Biotécnicas aplicadas à reprodução bovina: generalidades. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 55-65, 2012.

ZÚCCARI, C. E. S. N. et al. Seleção em gradientes de Percoll[®] sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção animal**, v. 9, n. 2, p. 358-366, 2008.

6 ANEXOS

ANEXO A - LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL DA EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, PELOTAS, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.



**ANEXO B - EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, ESTAÇÃO EXPERIMENTAL
TERRAS BAIXAS PELOTAS, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.**



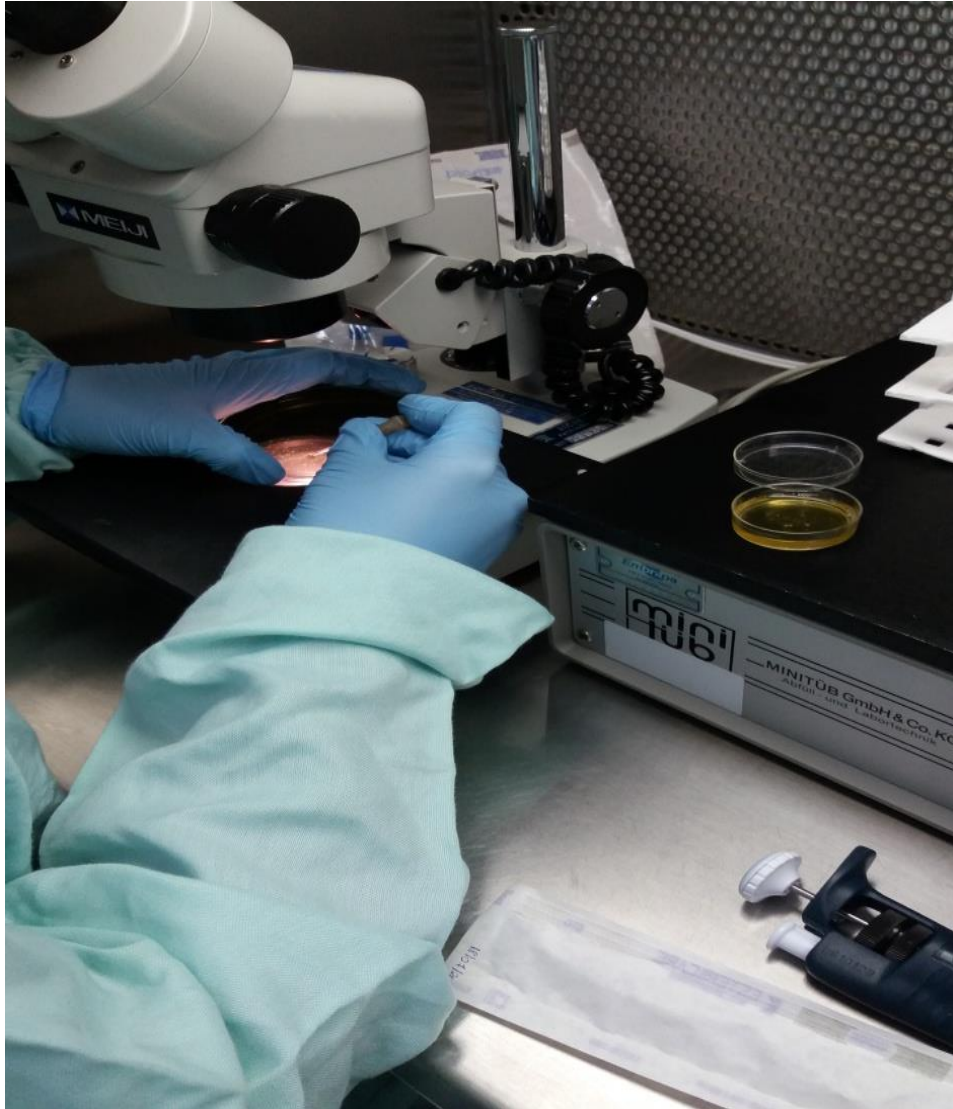
ANEXO C - ASPIRAÇÃO FOLICULAR DE OVÁRIO BOVINO REALIZADO DURANTE O ESTÁGIO NO LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL DA EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, PELOTAS, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.



ANEXO D - BOMBA DE VÁCUO UTILIZADA PARA A REALIZAÇÃO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR NO LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL DA EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, PELOTAS, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.



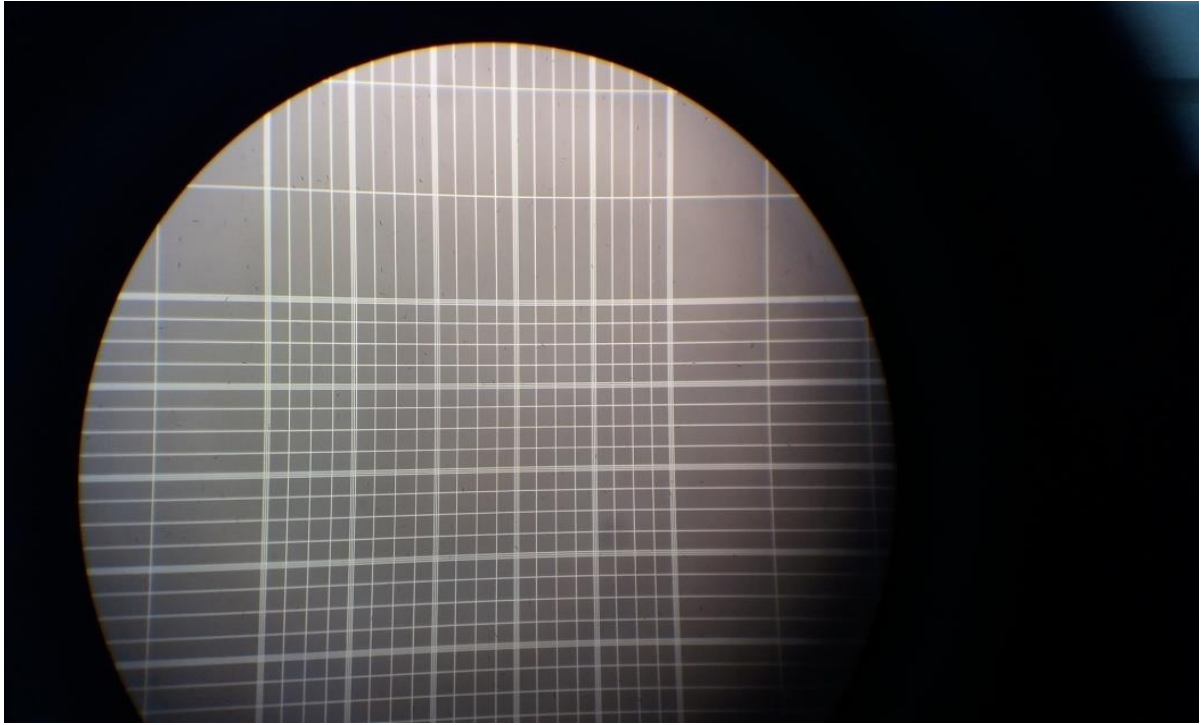
ANEXO E - SELEÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS REALIZADA DURANTE O ESTÁGIO NO LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL DA EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, PELOTAS, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.



ANEXO F - ESTUFA DE CULTIVO DE EMBRIÕES DO LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL DA EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, PELOTAS, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.



ANEXO G - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA NA CÂMARA DE NEUBAUER REALIZADO NO LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL DA EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, PELOTAS, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.



ANEXO H - AVALIAÇÃO DA CLIVAGEM DE EMBRIÕES BOVINOS DURANTE O ESTÁGIO REALIZADO NO LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL DA EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, PELOTAS, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.



ANEXO I - AVALIAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS DURANTE O ESTÁGIO NO LABORATÓRIO DE REPRODUÇÃO ANIMAL DA EMBRAPA CLIMA TEMPERADO, PELOTAS, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.



ANEXO J - CERTIFICADO DO MINICURSO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO REALIZADO DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA.

Certificado

Certificamos que

Ronaldo Junior da Silva

participou do *Minicurso de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)*, realizado pela Embrapa Clima Temperado e a Embrapa Gado de Leite, no dia de 27 de julho de 2017, em Pelotas,RS, com carga horária de 08 horas.

Pelotas, 27 de julho de 2017.



Clenio Nalito Pillon
Chefe-Geral
Embrapa Clima Temperado



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



**ANEXO L - CERTIFICADO DO SEMINÁRIO DE BIOSEGURIDADE NA CADEIA
PRODUTIVA DO LEITE REALIZADO DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA.**

Certificado

Certificamos que

Ronaldo Junior da Silva

participou da Comissão Organizadora do *Seminário de Bioseguridade na Cadeia Produtiva do Leite*, realizado pela Embrapa Clima Temperado, na Estação Experimental Terras Baixas no dia 19 de outubro de 2017, no Capão de Leão, RS, com carga horária total de 04 horas.

Pelotas, 19 de outubro de 2017.


Clenio Naito Pilon
Chefe-Geral
Embrapa Clima Temperado



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



**ANEXO M - ATESTADO DE CONCLUSÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA.**



ATESTADO

Atestamos que Ronaldo Júnior da Silva efetuou estágio neste Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado no período de 10/07/2017 a 10/11/2017, totalizando 540 horas, na área de reprodução animal, sob a orientação da pesquisadora Ligia Margareth Cantarelli Pegoraro.

Pelotas, 10 de Novembro de 2017.


Gabriel Mauch de Freitas
Setor de Gestão de Pessoas
Embrapa Clima Temperado