CENTRO UNIVERSITÁRIO CATÓLICA DO TOCANTINS
MEDICINA VETERINÁRIA

GIULIA BARBOSA GOULART DA SILVA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO – INFLUÊNCIA DO GRAU DE DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO *IN VITRO* NA TAXA DE CONCEPÇÃO EM BOVINOS

Palmas -TO
2021

Giulia Barbosa Goulart da Silva

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO – INFLUÊNCIA DO GRAU DE DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO *IN VITRO* NA TAXA DE CONCEPÇÃO EM BOVINOS

Relatório de Estágio Curricular Supervisionado, apresentado ao Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Católica do Tocantins, como pré-requisito para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Professor Orientador(a): Eudes Vieira Castro

Palmas - TO

2021

Dedico este trabalho à minha família, amigos, professores e animais de estimação por estarem sempre comigo até a conclusão deste sonho de criança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, que me deram a oportunidade de seguir esse sonho que tinha desde criança e foram aqueles que me ensinaram sempre buscar por conhecimento e estudo, sempre me fizeram ir mais longe, sem vocês nada disso teria sido possível.

A meus irmãos, Giovanna, Murilo e Eduardo, por me alegrem nos dias difíceis e me ajudarem nos estudos e trabalhos durante a faculdade.

Ao meu namorado Victor Daniel, que há mais de sete anos me acompanha na luta por esse sonho, me apoiando, incentivando, criticando e sendo meu porto seguro e ombro amigo quando preciso.

Aos meus animais de estimação que me acompanharam durante esse período, Grafite, Sasá, Nala e Anitta, e aqueles que se foram durante esse tempo, Bruce e Boni, que me alegraram e confortaram nos momentos difíceis, me lembravam dos motivos para nunca desistir.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram e me fizeram ter momentos maravilhosos durante esse período. Aos amigos feitos na faculdade meus agradecimentos em especial, por serem meus companheiros e tornarem as madrugadas muito mais animadas quando reunidos para estudar.

A todos os professores que tive ao longo da minha educação, sem vocês não haveria nenhum profissional. Agradeço especialmente aos da graduação, que foram meus modelos como profissionais e incentivadores para ir cada dia mais longe.

Ao meu professor orientador Eudes Vieira Castro, pelo auxílio, disponibilidade de tempo, paciência e por sempre acreditar no meu potencial.

Ao médico veterinário Daniel Ferreira, por ter me dado a primeira oportunidade de estágio, compartilhando tantos ensinamentos valiosos.

E por fim, mas não menos importante, a toda a equipe da Mader Embriões que abriu as portas para mim e me acolheram com muito carinho e paciência. Em especial a minha supervisora Marina Trevisolli, que se tornou não apenas tutora mais uma amiga e me ajudou na construção deste TCC.

“Talvez esse seja o segredo. Não é o que fazemos, mas o motivo por que fazemos.” - Tyrion Lannister

Game of Thrones

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fachada do escritório da empresa Mader Embriões *in vitro*, Gurupi- TO. 12
Figura 2: Área de atendimento e recepção, Mader Embriões *in vitro*. 13
Figura 3: Sala do setor financeiro, jurídico e contábil, Mader Embriões *in vitro*. 14
Figura 4: Sala do setor administrativo, Mader Embriões *in vitro*. 14
Figura 5: Área da copa, Mader Embriões *in vitro*. 14
Figura 6: Área de armazenamento de materiais do campo, Mader Embriões *in vitro*. 15
Figura 7: Área de armazenamento de materiais e equipamentos Mader Embriões *in vitro*...15
Figura 8: Área suja, laboratório. 16
Figura 9: Sala de FIV, laboratório. 17
Figura 10: Sala de armazenamento, laboratório. 17
Figura 11: Sala de atendimento, laboratório. 18
Figura 12: Sala de recepção, laboratório. 18
Figura 13: Organograma da estrutura organizacional atual da empresa. 18
Figura 14- Atividades acompanhadas e/ou realizadas durante o período do estágio, quantidade e porcentagem (%). 20
Figura 15: Incubadora portátil para tubos de maturação *in vitro* (MIV). 21
Figura 16: Tubos de MIV, com meio de maturação *in vitro* e óleo mineral 21
Figura 17: Placa de FIV, com gotas de meio de fecundação *in vitro* e óleo mineral. 23
Figura 18: Ilustração do gradiente eppendorf. 23
Figura 19: Passagem do sêmen para o eppendorf. 24
Figura 20: Sêmen dentro do eppendorf antes da centrifugação.....24
Figura 21: Fecundação *in vitro,* manipulação da dose inseminante nas gotas com oócitos no estereomicroscópio. 25
Figura 22: Fecundação *in vitro,* oócitos com espermatozoides na gota da placa de FIV sendo visualizados pelo estereomicroscópio. 26
Figura 23: Cultivo *in vitro.* A: estruturas fecundadas nas gotas de CIV durante a lavagem. B: manipulação das estruturas fecundadas durante a lavagem utilizando um estereomicroscópio. 27
Figura 24: Estruturas clivadas e mortas visualizadas no estereomicroscópio 3 dias após a FIV. 27
Figura 25: Manipulação das estruturas no dia da análise de clivagem, utilizando um sistema com pasteur de vidro. 28

Figura 26: Embriões BL, BX, BN e BE vistos pelo estereomicroscópio no meio de CIV, 7 dias após a FIV. 29
Figura 27: Representação da palheta de envase. Laranja: lacrador; Azul: meio TE; Rosa: embrião; Amarelo: buchinha.....29
Figura 28: Palheta de envase sob a placa aquecedora, lacradores numerados.....30
Figura 29: Preparo para DT, uma gota contendo meio ponta (meio 20% + meio DT) e duas gotas de meio DT.....31
Figura 30: Palhetas na máquina de DT.....31
Figura 31: Preparo para vitrificação, placa de 90mm contendo gotas com os meios que causam desidratação, manipulação no estereomicroscópio.....32
Figura 32: Envase para vitrificação, manipulação das estruturas feita com pasteur de vidro e colocadas nas OPS. 32
Figura 33: Aspiração folicular, introdução da guia de aspiração na vagina e da mão no reto da vaca.....35
Figura 34: Bomba de aspiração com aquecedora e ultrassom conectado ao transdutor da guia de aspiração. 36
Figura 35: Incubadora portátil com os tubos MIV.....36
Figura 36: Material e equipamento usados no treinamento de seleção de oócitos.....37
Figura 37: Oócitos selecionados no dia 27 de setembro de 2021, classificados em Grau I, II, II, desnudos e com citoplasma irregular.....38
Figura 38: Cronologia do protocolo de TETF feito por Colombo (2016) em vacas da raça nelore.....48
Figura 39: Classificação do desenvolvimento dos embriões de acordo com sua estrutura...50
Figura 40: Quantidade de prenhes e taxa de concepção (%) de acordo com a classe de embriões produzidos *in vitro* e transferidos com 7 dias de desenvolvimento. 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Produção de Embriões *in vitro* comercial e de teste, do dia 09 de agosto à 17 de novembro de 2021, pela Mader Embriões. 20
Tabela 2 – Resultado da OPU na fazenda em Formoso- TO no dia 23/09/2021. 34
Tabela 3 – Resultado da OPU na fazenda em Alvorada – TO no dia 23/09/2021.....34
Tabela 4 – Relatório geral do treinamento de seleção de oócitos.....37
Tabela 5 – Relatório de Clivagem dos oócitos que foram para laboratório. 37
Tabela 6- Quantidade e percentual (%) de fêmeas prenhas de acordo com a classe de embriões produzidos *in vitro* e transferidos com 7 dias de desenvolvimento. 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Siglas	Significado
%	Porcentagem
°C	Graus celsius
µl	Microlitros
BE	Blastocisto eclodido
BI	Blastocisto inicial
BL	Blastocisto
BN	Blastocisto em eclosão
BSA	Albumina sérica bovina
BX	Blastocisto expandido
CIV	Cultivo *in vitro*
CL	Corpo lúteo
CO_2	Gás carbônico/ Dióxido de carbono
DT	*Direct transfer*
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
FIV	Fertilização *in vitro*
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
h	Horas
HEPES	Ácido hidroxi-etil-piperazina-etano-sulfônico
IATF	Inseminação em tempo fixo
IFN_T	Interferon-tau
LAV	Meio de lavagem
LH	Hormônio luteinizante
MCI	Massa celular interna
min	Minutos
MIV	Maturação *in vitro*

ml	Mililitros
mm	Milímetros
NL_2	Nitrogênio líquido
O_2	Gás oxigênio
OPS	*Open pulled straw*
OPU	*Ovum Pick Up/* Aspiração folicular
p.H.	Potencial hidrogeniônico
$PGF_{2\alpha}$	Prostaglandina
PIVE	Produção *in vitro* de embrião
rpm	Rotação por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SOF	Fluido sintético do oviduto
TCM-199	*Tissue culture medium 199*
TE	Transferência de embrião
TETF	Transferência de embrião em tempo fixo

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – RELATÓRIO DE ESTÁGIO 11

1. INTRODUÇÃO 11

2. DESCRIÇÃO GERAL DO LOCAL DE ESTÁGIO 12

2.1. ESTRUTURA FÍSICA 12

2.2. ESTRUTURA ORGANIZACIONAL 18

3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESTÁGIO 19

3.1. ATIVIDADES ACOMPANHADAS E/OU REALIZADAS 20

3.2. PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO* 21

3.2.1. Recepção de oócitos 21

3.2.2. Maturação dos oócitos 22

3.2.3. Fertilização *in vitro* (FIV) 22

3.2.4. Cultivo *in vitro* (CIV) 26

3.2.5. Clivagem 27

3.2.6. Previsão 28

3.2.7. Transferência a fresco 29

3.2.8. Direct Transfer (DT) 30

3.2.9. Vitrificação 31

3.3. MANUTENÇÃO DO LABORATÓRIO 33

3.4. ASPIRAÇÃO FOLICULAR (OPU) E SELEÇÃO DE OÓCITOS 34

3.5. TREINAMENTO: SELEÇÃO DE OÓCITOS 36

CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DO GRAU DE DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO *IN VITRO* NA TAXA DE CONCEPÇÃO EM BOVINOS 39

Resumo 39

1. INTRODUÇÃO 39

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 40

2.1. FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO 40
2.1.1. Ovulação 40
2.1.2. Fertilização 41
2.1.3. Fase germinativa 42
2.1.4. Fase embrionária 43
2.2. PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO* (PIVE) 44
2.2.1. Aspiração folicular (OPU- Ovum pick up) 45
2.2.2. Maturação *in vitro* 45
2.2.3. Fertilização *in vitro* 46
2.2.4. Cultivo *in vitro* 47
2.2.5. Transferência de Embrião em Tempo Fixo (TETF) 48
3. METODOLOGIA 49
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 50
5. CONCLUSÃO 53
6. REFEREÊNCIAS 53
CAPITULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS 58

CAPÍTULO 1 – RELATÓRIO DE ESTÁGIO

1. INTRODUÇÃO

O estágio curricular supervisionado tem como objetivo inserir o acadêmico de medicina veterinária no cotidiano da área de sua preferência, a fim de complementar seus conhecimentos teóricos e práticos e exercer aqueles adquiridos durante o período de aprendizado no Centro Universitário Católica do Tocantins (UniCatólica) .Essa etapa da graduação é supervisionada por um médico veterinário, que fica responsável por orientar e avaliar o acadêmico que busca a conclusão da graduação no curso superior.

O local de estágio supervisionado escolhido para o estágio foi a empresa Mader Embriões *In vitro*, situada na cidade de Gurupi – TO, fundada em 2013 e administrada pelo médico veterinário Arthur Rodrigues Mader, graduado em 2004 pela Universidade de Uberaba. Atualmente a empresa possui um laboratório de produção de embriões *in vitro* (PIVE) sob a coordenação da médica veterinária Marina Anchieta Trevisoli, graduada na Universidade Estadual Paulista (UNESP), sendo ela a supervisora de estágio designada.

A vigência do estágio ocorreu entre os dias 09 de agosto a 17 de novembro e totalizou 400 horas, sendo as atividades exercidas em maior parte no laboratório de PIV no auxílio e execução de procedimentos na produção, lançamento de dados no sistema da empresa, organização e limpeza do laboratório. Em menor parte foram feitos a campo, em auxílio durante procedimento de aspiração folicular (*Ovum Pick Up,* OPU) e seleção de oócitos. Podendo desta forma acompanhar de maneira mais ampla a produção *in vitro* de embriões bovinos.

A escolha dessa área foi por experiências anteriores em laboratório de pequenos animais e pela já realização nesta mesma empresa de um estágio extracurricular no laboratório em 2020/2, despertando um maior interesse em aprender e realizar as etapas da produção *in vitro*(PIV) de embriões bovinos, visto que é uma biotecnologia que está ganhando cada vez mais espaço no estado do Tocantins por diminuir o tempo entre as gerações do rebanho, boa rentabilidade e gerar uma maior quantidade de embriões e prenhez por unidade de tempo.

Desta forma, este relatório objetiva descrever as atividades realizadas na empresa Mader Embriões *in vitro* durante o estágio supervisionado e relator um caso de interesse sobre a influência do grau de desenvolvimento do embrião *in vitro* na taxa de concepção em bovinos.

2. DESCRIÇÃO GERAL DO LOCAL DE ESTÁGIO

Atualmente a empresa que concedeu o estágio curricular, a Mader Embriões *In vitro*, trabalha ofertando serviços voltados para a reprodução animal, como consultoria, produção de embriões *in vitro* (aspiração folicular, maturação *in vitro*, fertilização *in vitro*; o cultivo *in vitro*, e transferência de embriões em tempo fixo), inseminação em tempo fixo (IATF), diagnóstico de prenhez, sexagem e andrológico.

2.1. ESTRUTURA FÍSICA

A empresa é situada na cidade de Gurupi – TO, com endereço na Avenida Piauí, Região Central, Lote 1640, foi fundada em 2013 pelo médico veterinário Arthur Mader e possui a fachada apresentada na Figura 1. A empresa possui um escritório no térreo e há dois anos instalou o laboratório de PIVE no primeiro andar, no qual a entrada é separada do escritório.

Figura 1: Fachada do escritório da empresa Mader Embriões *in vitro*, Gurupi- TO.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021.

No escritório temos a área de atendimento e recepção (figura 2), onde é feito os lançamentos de alguns dados da produção e do campo, orçamentos de materiais e demais serviços de secretaria. Há uma sala para o setor financeiro, jurídico e contábil (Figura 3), um banheiro, e uma sala pra o setor administrativo que também é utilizada como sala de reuniões com clientes e colaboradores (Figura 4). Além disso, há também uma copa reservada para os funcionários, sendo está equipada com frigobar e demais utensílios de cozinha (Figura 5).

Figura 2: Área de atendimento e recepção, Mader Embriões *in vitro*.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021.

Figura 3: Sala do setor financeiro, jurídico e contábil, Mader Embriões *in vitro*.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021.

Figura 4: Sala do setor administrativo, Mader Embriões *in vitro*.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021.

Figura 5: Área da copa, Mader Embriões *in vitro*.

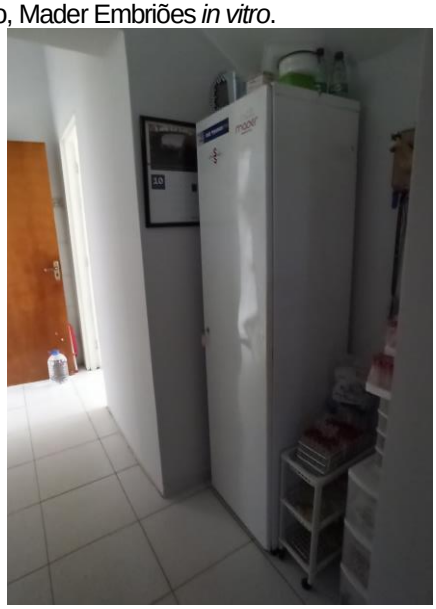


Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

‘’

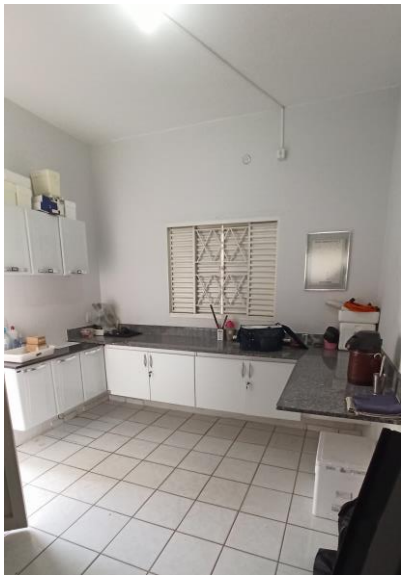
Para os materiais e demais insumos utilizados nos procedimentos da empresa, há um local reservado com geladeira (Figura 6) para materiais usados no campo. Uma sala conectada ao escritório armazena materiais, equipamentos e era usada para os treinamentos de seleção de oócitos (Figura 7). Por fim, há uma sala separada com os botijões de sêmen e alguns equipamentos usados na OPU e IATF.

Figura 6: Área de armazenamento de materiais do campo, Mader Embriões *in vitro*.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

Figura 7 Área de armazenamento de materiais e equipamentos Mader Embriões *in vitro*.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

O laboratório possui uma sala suja (Figura 8), no qual é feita a higienização dos colaboradores, sempre ao chegar, esterilização em autoclave, limpeza de materiais e uma estufa e armários para armazenagem de materias.

A sala de FIV (Figura 9) possui dois fluxos unidirecionais horizontais (FUH, Grupo VECO®) duas incubadoras (Thermo Scientific®, Serie 3 Water Jacketed), dois gaveteiros para armazenamento, duas máquinas de congelamento lento (TK Tecnologia®), uma microcentrífuga digital (KASVI®) e um agitador tipo vórtex mixer (IONLAB®).

A sala de armazenamento possui os matérias estocados em um armário, uma geladeira com os meios e demais insumos usados, uma balança de precisão e os botijões com nitrogênio líquido, que armazenam sêmen e embriões congelados (Figura 10)

Figura 8: Área suja, laboratório.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

Figura 9: Sala de FIV, laboratório.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

Figura 10: Sala de armazenamento, laboratório.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

Há uma sala de atendimento (Figura 11) com computador, onde é feito o lançamento dos dados da produção e prateleiras com fichários organizados por estação contendo as fichas de produção comercial. No laboratório também há uma sala de recepção por onde os clientes entram, essa área é separada por uma porta de vidro, sendo aberta apenas quando há chegada de cliente (Figura 12).

Figura 11: Sala de atendimento, laboratório.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

Figura 12**:** Sala de recepção, laboratório.

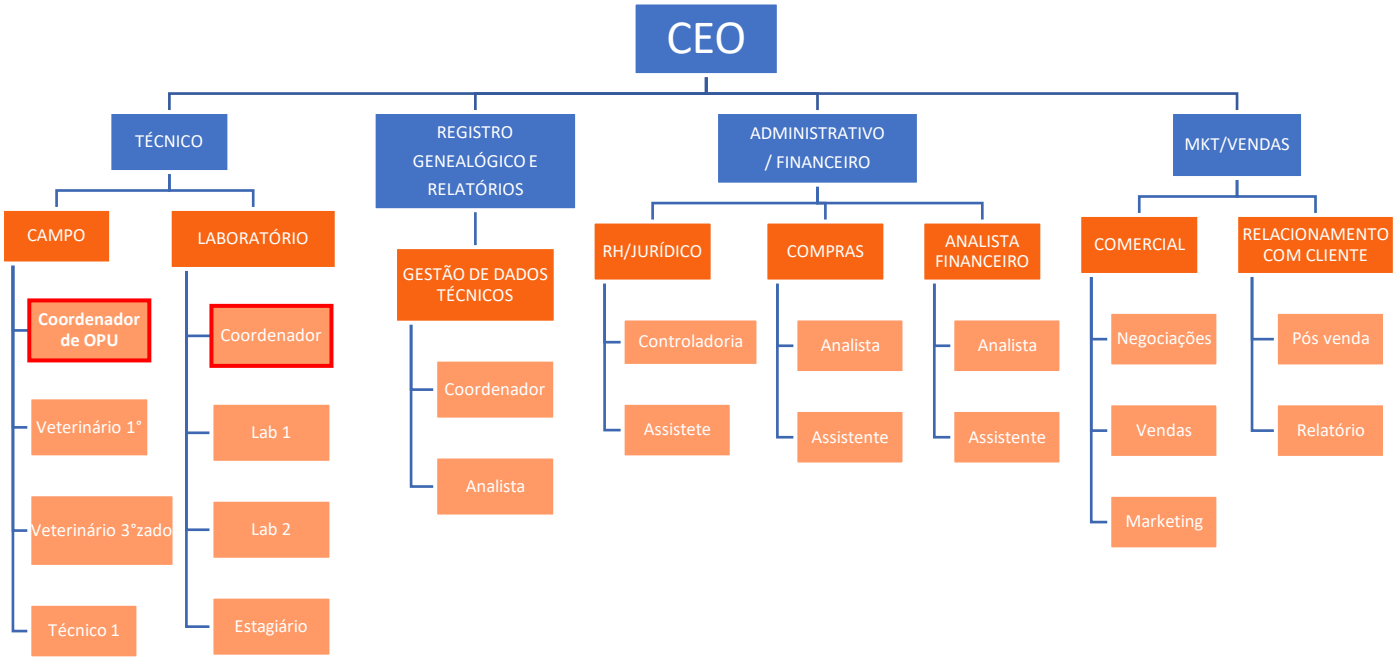


Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

2.2. ESTRUTURA ORGANIZACIONAL

A empresa atualmente possui a estrutura mostrada na figura 13, uma equipe de campo dividida em subequipes de OPU e TETF/IATF, a equipe do laboratório, equipe responsável pelos registros genealógicos e dos relatórios, equipe administrativa e financeira e por fim equipe de vendas e marketing.

Figura 13: Organograma da estrutura organizacional atual da empresa.



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESTÁGIO

A rotina do laboratório de PIVE gira em torno dos dias em que são realizadas as OPUs, sendo feitos em sequência as etapas de: recepção de oócitos que chegam das fazendas; maturação; a fertilização *in vitro* (FIV); o cultivo *in vitro* (CIV)*;* clivagem (D3); a previsão de embriões, que acontece 6 dias após a FIV; e a saída dos embriões, que podem ser levados para a fazenda a fresco ou são criopreservados no laboratório pelo método de congelamento lento, denominado *Direct Transfer* (DT), ou vitrificação.

As etapas citadas foram acompanhadas e auxiliadas pela estagiária, mas executadas pela coordenadora do laboratório e a laboratorista em treinamento*,* quando feitas para produções comerciais. No caso de produções de teste para o laboratório foi autorizado a execução de algumas etapas para treino prático no estágio, além de ter sido feito uma produção completa. Também foi feito uma reunião instrutiva para o uso do sistema da empresa, dessa forma aprendendo a realizar os lançamentos de dados necessários.

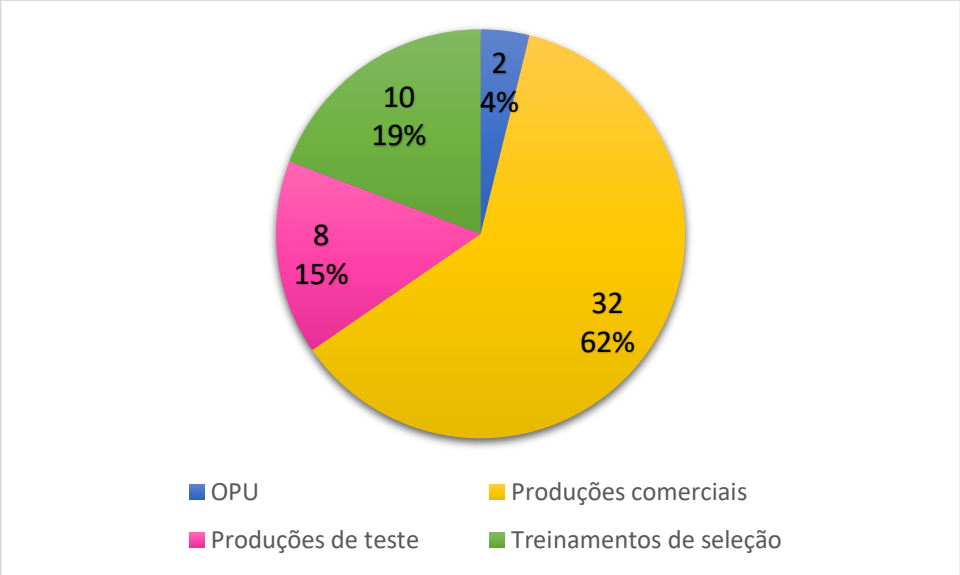
Outras atividades executadas no laboratório se remetem a manutenção do mesmo, sendo feita uma limpeza e esterilização de material uma vez na semana, pesagem de meios usados, medição de nitrogênio, contagem do estoque de material e limpeza das câmaras de fluxo unidirecional horizontal. Durante o período de estágio também foram feitos dez

treinamentos para seleção de oócitos sob supervisão do médico veterinário Luís Paulo Sanches Euzébio. À campo foi acompanhado em duas fazendas o procedimento de OPU e seleção de oócitos.

3.1. ATIVIDADES ACOMPANHADAS E/OU REALIZADAS

Durante o período de estágio foram feitas trinta e duas produções comerciais, oito produções de teste, acompanhadas duas OPUs e feitos dez treinamentos para seleção de oócitos, sendo visto a casuística Na Figura 14.

Figura 14- Atividades acompanhadas e/ou realizadas durante o período do estágio, quantidade e porcentagem (%).



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Na produção *in vitro* de embriões comerciais e de testes foram obtidos os dados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Produção de Embriões *in vitro* comercial e de teste, do dia 09 de agosto à 17 de novembro de 2021, pela Mader Embriões.

	Produção comercial	**Produção em teste**	**TOTAL**
Oócitos viáveis	9351	577	9928
Total de embriões produzidos	3779	235	4014
Embriões transferidos (TE)	2108	11	2119

Embriões Congelados DT	415	17	432
Embriões Vitrificados	28	577	605
Embriões Totais/ Oócitos viáveis	40,4%	40,7%	40,4%

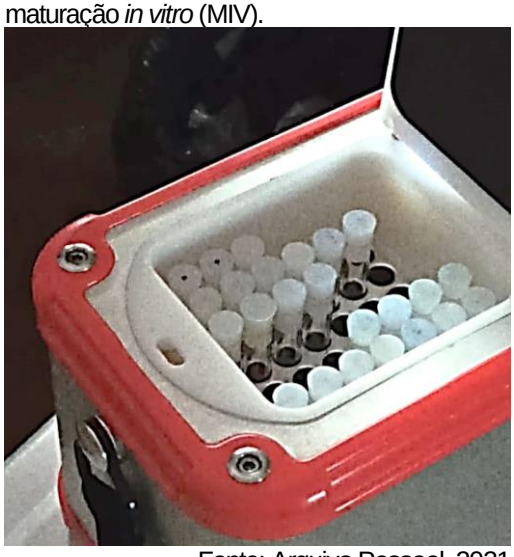
Fonte: Elaborado pela autora (2021)

3.2. PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO*

3.2.1. Recepção de oócitos

Os oócitos chegavam do campo em incubadoras portáteis apropriadas (Figura 15) que eram limpas externamente com álcool 70% ao chegarem no laboratório, em seguida era feita aferição da temperatura dentro da incubadora com um termômetro digital, ela deveria estar com 37,5°C para manter a qualidade dos gametas. Os tubos de poliestireno (5 ml) onde se encontram os oócitos imersos em meio de maturação e óleo mineral (Figura 16), eram abertos dentro da câmara de fluxo unidirecional horizontal, colocados em um suporte devidamente identificado e colocados no fundo da estufa com temperatura de 38,8°C e 5% de dióxido de carbono (CO_2).

Figura 15: Incubadora portátil para tubos de maturação *in vitro* (MIV).



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

Figura 16: Tubos de MIV, com meio de maturação *in vitro* e óleo mineral



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

3.2.2. Maturação dos oócitos

Esse processo acontecia a partir do momento que os oócitos eram colocados nos tubos após a seleção e depois na incubadora ao chegarem no laboratório, durando 20h a 24h, ao final desse tempo a FIV é realizada. O meio de maturação usado era preparado 24h a 48h antes da OPU e colocado dentro dos tubos de poliestireno na quantidade de 400µl com 240µl de óleo mineral por cima, tendo como função auxiliar para a maturação nuclear até alcançar a fase de metáfase da segunda divisão meiótica, simulando o momento que seria a ovulação.

3.2.3. Fertilização *in vitro* (FIV)

A placa de FIV era preparada 24h a 48h antes, sendo usado uma placa de petri de 35mm e distribuindo o meio FIV em até 8 gotas, sendo 50µl quando usado sêmen sexado e 60µl para convencional. As gotas então eram cobertas por 3,6ml de óleo mineral, essa placa permanece na estufa em cima de um fraco para cultivo preenchida de água para autoclave, identificada pelo número, data da OPU e nome do cliente.

Tendo passado o período de maturação era iniciado o preparo para a FIV, primeiramente era colocado em uma placa de petri de 60mm duas gotas de meio FIV por vaca doadora, podendo ser usadas mais placas ou gotas caso necessário, em seguida os tubos

contendo os oócitos eram retirados da estufa e lavados nas gotas de FIV de acordo com cada doadora, após isso, colocados na placa de 35mm, sendo aceito em cada gota no máximo 30 oócitos, esse processo e lavagem e separação era feito utilizado um estereomicroscópio (Nikon® SMZ645) (Figura 17).

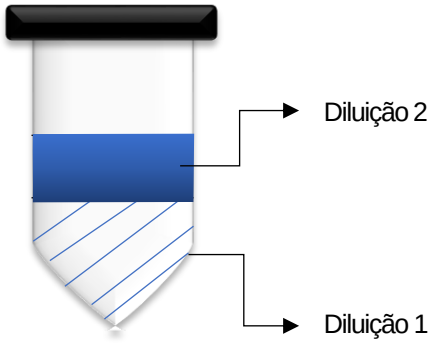
Figura 17: Placa de FIV, com gotas de meio de fecundação *in vitro* e óleo mineral.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

Simultaneamente com o processo anterior era feito o preparo do sêmen que era usado na fertilização. Era preparada a quantidade de eppendorf de acordo com a quantidade de touros e a partida do sêmen, o gradiente era feito de duas formas, uma para quando o sêmen é sexado e outra quando era convencional. Para o primeiro era colocado a 1° diluição com 100µl de percoll 90% e 300µl de *sperm* (capacitador espermático) e a 2° diluição com 350ul de percoll 90% e 50ul de *sperm*. Para o segundo, a 1° diluição era com 400µl de percoll 90% e a 2° diluição com 200µl de percoll 90% e 50µl de *sperm* (Figura 18). Os eppendorf eram então colocados na incubadora por no mínimo 10 minutos.

Figura 18: Ilustração do gradiente eppendorf.



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

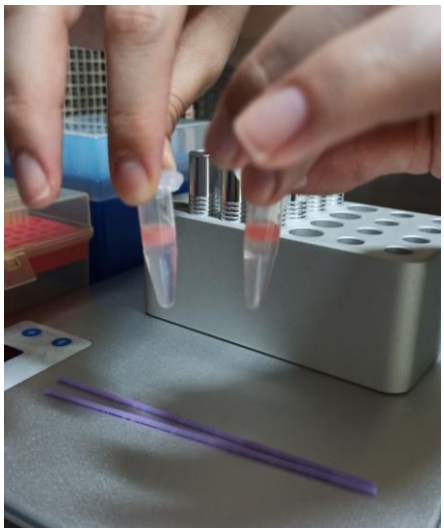
O sêmen utilizado era separado e retirado do botijão de nitrogênio, colocado no descongelador com temperatura da água em 36°C durante 30 segundos. Em seguida, dentro da câmara de fluxo, o sêmen era retirado da palheta e colocado no eppendorf (Figura 19 e 20), posteriormente era feita a centrifugação, quando sexado são feitas duas rodadas, a 1° de 5 min na velocidade 7.000 rpm e a 2° de 3 min e 5.000rpm. Para o sêmen convencional era feito apenas uma rodada de 5 min na velocidade de 3.000rpm. Esse procedimento tinha como finalidade a seleção dos espermatozoides viáveis.

Figura 19: Passagem do sêmen para o eppendorf.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

Figura 20: Sêmen dentro do eppendorf antes da centrifugação.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

Finalizado a centrifugação, era retirado o sobrenadante deixando apenas o pellet, em seguida é acrescentado meio FIV pra diluição de acordo com a concentração, sendo colocado menos para o sexado por apresentar concentrações mais baixas. Após isso a placa de FIV era levada ao fluxo e se inicia a fecundação das gotas contendo os oócitos já lavados (Figura 21), em média era usado 10µl de sêmen convencional para fecundar e para o sêmen sexado era feita a divisão da solução presente no eppendorf pela quantidade de gotas que devem ser fecundadas por aquele touro.

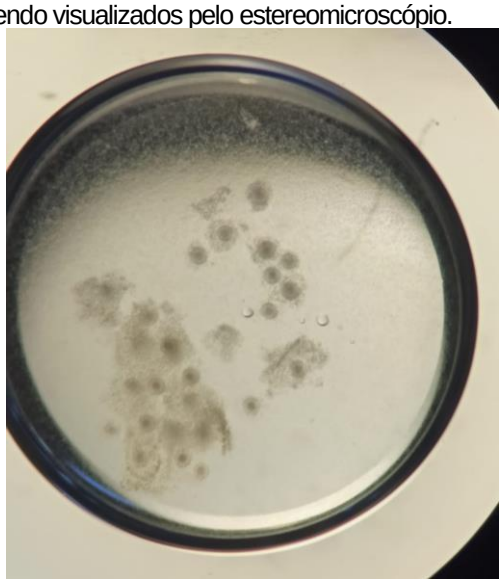
Quando finalizada a fecundação da gota, a placa era levada ao estereomicroscópio para avaliação qualitativa do sêmen (Figura 22), a motilidade, concentração e vigor. Finaliza então a FIV e as placas são levadas novamente a estufa que mantém o padrão de 38,8°C e 5% de CO_2.

Figura 21: Fecundação *in vitro,* manipulação da dose inseminante nas gotas com oócitos no estereomicroscópio.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

Figura 22: Fecundação *in vitro,* oócitos com espermatozoides na gota da placa de FIV sendo visualizados pelo estereomicroscópio.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

3.2.4. Cultivo *in vitro* (CIV)

Assim como na FIV, a placa e o meio CIV eram preparados com antecedência, sendo a placa preparada e colocada na estufa 24h a 48h antes do procedimento. Eram usadas também as placas de 35mm, mas as gotas para o cultivo eram feitas com 70µl de meio CIV e cobertas por 3,6ml de óleo mineral.

Essa etapa da produção era feita de 20h a 24h após a FIV. As placas de FIV eram retiradas da estufa, em seguida era feita a lavagem das estruturas fecundadas (Figura 23, A e

B) no meio CIV em 5 gotas para cada acasalamento, e retirada das mortas. As estruturas então eram passadas para a placa de CIV juntamente com células cúmulos de bom aspecto, o método de cultivo utilizado era com baixa tensão de O_2. Com 5% de CO_2.

Figura 23: Cultivo *in vitro.* A: estruturas fecundadas nas gotas de CIV durante a lavagem. B: manipulação das estruturas fecundadas durante a lavagem utilizando um estereomicroscópio.

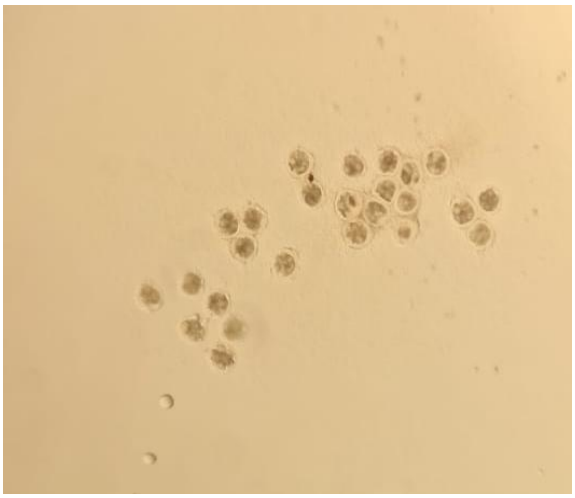


Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

3.2.5. Clivagem

Na análise de clivagem as estruturas devem possuir de 2 ou mais células ((Figura 24), era feita 3 dias após a FIV, nessa etapa as estruturas presentes nas gotas são reorganizadas, separando as que estejam aderidas umas nas outras e do “tapete” que se forma no fundo da placa pelas células do *cumulus*, sendo utilizado uma pipeta pasteur de vidro para isso (Figura 25). Também era feita a retirada das estruturas mortas e a reposição do meio de CIV nas gotas, sendo retirado 47µl e acrescentando a mesma quantidade de meio novo.

Figura 24: Estruturas clivadas e mortas visualizadas no estereomicroscópio 3 dias após a FIV.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

Figura 25: Manipulação das estruturas no dia da análise de clivagem, utilizando um sistema com pasteur de vidro.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

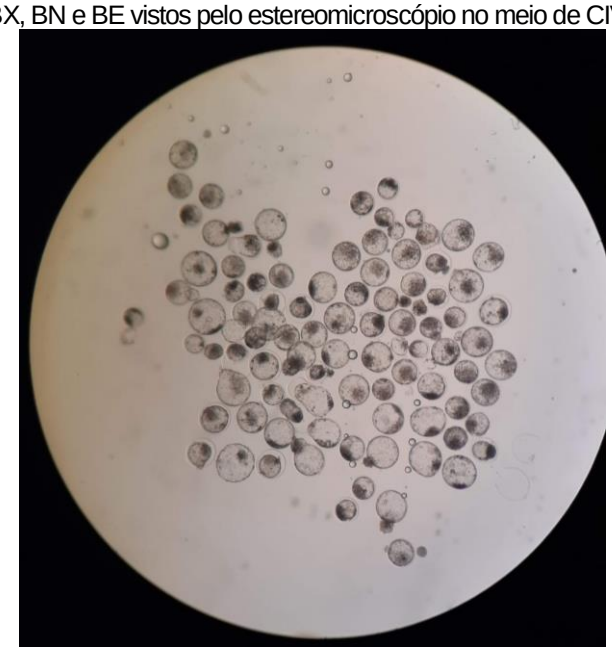
3.2.6. Previsão

Nessa etapa era possível visualizar os embriões em diferentes fases de desenvolvimento, mas principalmente nas fases de mórula e blastocisto inicial. Era feita a contagem daqueles com melhor qualidade, que podem estar aptos para o último processo e desenvolverem para as próximas fases. As classificações de graus embrionários são por ordem de desenvolvimento: mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto eclodindo e blastocisto eclodido. Nesse processo também era feita a renovação do meio de cultivo.

3.2.7. Transferência a fresco

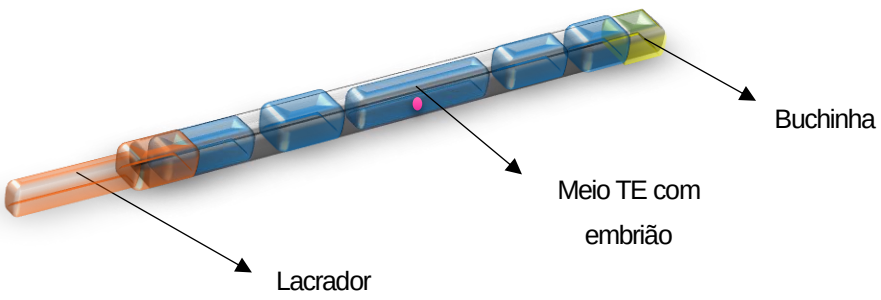
A transferência a fresco é feita sete dias após a FIV. É realizada a contagem e classificação dos embriões que serão transferidos (Figura 26), o envase é feito em uma palheta de 0,25µl e usado o meio de transferência embrionária (TE) para essa etapa (Figura 27 e 28). Então é feita a sequência de envase: meio TE→ ar→ meio TE→ ar→ meio de cultivo com embrião→ ar→ meio TE→ ar→ meio TE.

Figura 26: Embriões BL, BX, BN e BE vistos pelo estereomicroscópio no meio de CIV, 7 dias após a FIV.



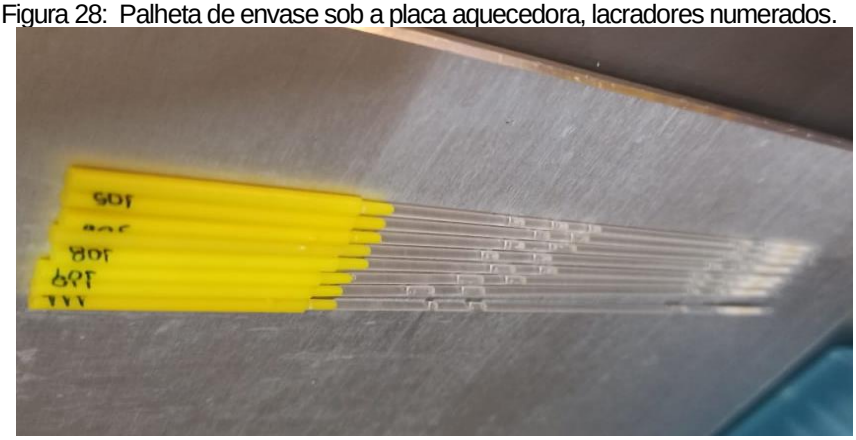
Fonte: Cedido por Marina Trevisoli, 2021

Figura 27: Representação da palheta de envase. Laranja: lacrador; Azul: meio TE; Rosa: embrião; Amarelo: buchinha.



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Figura 28: Palheta de envase sob a placa aquecedora, lacradores numerados.



Fonte: arquivo pessoal, 2021

As palhetas então são identificadas com lacradores contendo o número de identificação do embrião, e por fim, são colocadas na incubadora de transporte que deve estar a 36°C.

3.2.8. Direct Transfer (DT)

A técnica de *direct transfer* (DT) era usado para a criopreservação dos embriões de forma lenta, devendo ser escolhidos os de boa qualidade dentro dos pedidos pelo cliente para passarem por esse processo, por ele ser mais deteriorante, dando preferência aos na fase de BX com grau I. Os embriões eram preparados primeiramente no meio de envase com 20% de soro fetal bovino (SFB), denominado meio 20%, em quanto máquina de DT era resfriada até chegar à temperatura de -6°C. Posteriormente, era iniciado o envase dos embriões, que devem passar em duas gotas de meio DT antes de serem colocados na palheta, não devendo ultrapassar 8,5 minutos neste meio (Figura 29).

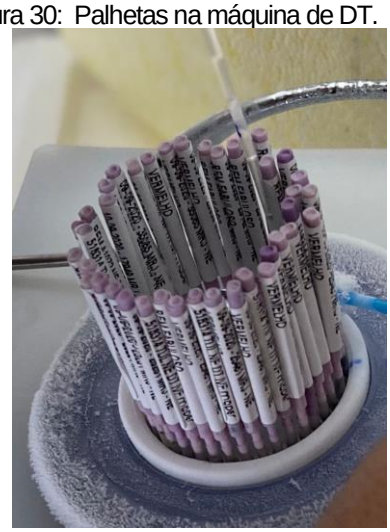
Para a montagem da palheta era usado o meio ponta, que é metade composto de meio 20% (meio envase + SFB) e metade de meio DT, e o meio DT onde o embrião ficava imerso. Então é montado na seguinte sequência: meio ponta→ ar→ meio ponta→ ar→ meio DT com o embrião→ ar→ meio ponta→ ar→ meio ponta. Os lacradores eram colocados com a identificação e as palhetas colocadas após 10 minutos na máquina de DT para o congelamento (Figura 30). Após 2 minutos é realizado o *seeding*, e em seguida é iniciada a curva de congelamento, logo a temperatura começa a diminuir de forma lenta.

Figura 29: Preparo para DT, uma gota contendo meio ponta (meio 20% + meio DT) e duas gotas de meio DT.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

Figura 30: Palhetas na máquina de DT.



Fonte: Cedido por Arthur Mader, 2021

Ao termino do congelamento, os embriões eram retirados de forma rápida e colocados em um recipiente contendo nitrogênio líquido (NL_2), finalizando o congelamento. As palhetas eram colocadas nas raques devidamente identificadas e iam para o botijão de armazenamento.

3.2.9. Vitrificação

Assim como o método de DT, este era usado para a criopreservação dos embriões a critério do cliente. O preparo do material a ser usado deveria ser feito com antecedência, a fim de que durante o processo tudo pudesse fluir de maneira rápida. Os meios e protocolos utilizados no laboratório para esse procedimento são da Botupharma®.

Era preparada uma placa contendo dois tipos de gotas com diferentes soluções que vão causar a desidratação do embrião e prepará-lo para um congelamento rápido. Na primeira solução os embriões permaneciam por 2 minutos, e eram passados para a segunda solução por mais 1 minuto, após isso eram pipetadas com a solução e passados para as palhetas abertas (*Open Pulled Straw*- OPS) já identificadas (Figura 31 e 32).

Figura 31: Preparo para vitrificação, placa de 90mm contendo gotas com os meios que causam desidratação, manipulação no estereomicroscópio.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

Figura 32: Envase para vitrificação, manipulação das estruturas feita com pasteur de vidro e colocadas nas OPS.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

Ao final do envase eles são mergulhados e um recipiente com o N_2 líquido. Nesse procedimento, diferente do DT, pode haver mais de um embrião por palheta, não excedendo três.

3.3. MANUTENÇÃO DO LABORATÓRIO

No laboratório havia uma rotina de limpeza semanal. Os fluxos unidirecionais horizontais eram limpos com clorexidina diluída em água por toda a extensão da superfície e vidros laterais, usando gazes para maior fricção, em seguida, enxaguados com água destilada, secados com papel toalha, e por fim passado álcool 70% com papel toalha por toda a superfície. Todo material dentro do fluxo era limpo com álcool 70% e expostos a raios ultravioleta (UV) por no mínimo 20 minutos.

As incubadoras eram limpas externamente com álcool 70%, e todo final de estação era feita a limpeza na parte interna, sendo feita a retirada das peças e lavagem delas com clorexidina, água destilada e álcool 70%, dentro da incubadora era usado somente o álcool 70%. Toda semana também era feita a medição de CO_2 dentro das incubadoras com o fyrite.

Os outros procedimentos realizados de forma semanal eram, a contagem de estoque do laboratório, reposição de material e esterilização em autoclave, pesagem de componentes usados para fazer os meios (MIV, FIV, CIV, LAV e TE), medição do NL_2 nos botijões do laboratório e lançamento de dados do final de semana.

Para o meio MIV, o meio base era o TCM- 199 com bicarbonato, que possui soros e/ou gonadotrofina e/ou hormônios esteroides que auxiliam na maturação dos oócitos e o bicarbonato que funciona como um tampão para manter o p.H. equilibrado. Para o meio de lavagem (LAV) também é utilizado o TCM-199, mas com HEPES (Ácido Hidroxi-Etil-Piperazina-Etano-Sulfônico) que também atua como uma forma de tampão.

O meio FIV possui como base um meio pronto, que é incrementado com antibiótico específico para FIV e albumina sérica bovina (BSA), sendo esse último usado como suplemento proteico, esse meio tem como principal função facilitar o processo de fecundação. O meio CIV e TE também possuem os meios bases prontos e são incrementados com o mesmo antibiótico e proteínas (BSA e SFB), tendo o meio de CIV função de suplementar o embrião durante o desenvolvimento e o meio TE de manter sua qualidade até a transferência para a receptora.

3.4. ASPIRAÇÃO FOLICULAR (OPU) E SELEÇÃO DE OÓCITOS

A aspiração folicular acompanhada ocorreu em duas fazendas com as vacas de escolha do cliente, geralmente são animais de maior valor genético da propriedade e/ou que possuem características que se queira multiplicar no plantel. O procedimento aconteceu no mesmo dia para ambas as fazendas (23/09/2021), sendo a primeira na parte da manhã na região de Formoso- TO e a outra à tarde na região de Alvorada- TO, tendo os resultados mostrados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Resultado da OPU na fazenda em Formoso- TO no dia 23/09/2021.

Dados	Resultado
Animais aspirados	9
Oócitos totais	275
Oócitos viáveis	187

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Tabela 3 – Resultado da OPU na fazenda em Alvorada – TO no dia 23/09/2021

Dados	Resultado
Animais aspirados	13
Oócitos totais	185
Oócitos viáveis	115

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Foi feito primeiro a limpeza externa do trato reprodutivo, em seguida era aplicado a anestesia epidural com lidocaína 2% com uma agulha 40mm x 1,2mm. A guia de aspiração folicular, que contém um transdutor micro convexo e uma agulha de punção conectado a um sistema a vácuo, era introduzido na vagina da vaca, em quanto a outra mão é colocado no reto do animal para a fixação do ovário (Figura 33).

Com o auxílio do ultrassom (7,5MHz), era feito o alinhamento do ovário com a cânula da agulha, tendo visível os folículos, era iniciada a aspiração atravessando a agulha pela parede vaginal até o ovário. O líquido coletado era passado pelo sistema a vácuo até um tubo de 50ml que contém de 5ml a 7ml de soro fisiológico 0,9% e antibiótico diluído, sendo que este tubo ficava em uma bomba a temperatura de 38°C até ser levado ao local de seleção de oócitos (Figura 34).

O local de seleção era montado na fazenda, dando preferência a um local limpo, fechado e sem exposição solar. Os tubos contendo os oócitos que chegavam da aspiração eram colocados em banho maria para preservar a temperatura, após isso eram passados em um filtro de membrana e feito o rastreio dos oócitos em uma placa de 90mm, separação e classificação dos graus no meio de lavagem (LAV). Feito isso, os oócitos eram colocados nos tubos contendo o meio MIV e óleo mineral, passado gás mistura para manter o p.H., em seguida, fechados com uma rolha de silicone e colocados na incubadora até chegarem no laboratório (Figura 35).

Figura 33: Aspiração folicular, introdução da guia de aspiração na vagina e da mão no reto da vaca.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

Figura 34: Bomba de aspiração com aquecedora e ultrassom conectado ao transdutor da guia de aspiração.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

Figura 35: Incubadora portátil com os tubos MIV.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

3.5. TREINAMENTO: SELEÇÃO DE OÓCITOS

Foram realizados dez treinamentos de seleção de oócitos, a fim de treinar a parte prática e para auxiliar caso seja necessário. Os treinamentos tinham acompanhamento de um médico veterinário com experiência e eram feitos relatórios com os resultados obtidos da seleção.

Foi ensinado no primeiro treinamento a montagem das mesas e equipamentos para a seleção, sendo utilizado um estereomicroscópio, uma placa aquecedora, um banho maria de

laboratório, pipetas, ponteiras, um filtro de membrana, uma seringa de 50ml com agulha, meio de lavagem e soro fisiológico 0,9% (Figura 36).

Os ovários usados no treinamento eram de abatedouro, e aspirados com uma bomba a vácuo. O veterinário responsável, Luís Paulo, aspirava os oócitos e os tubos eram passados para os estagiários realizarem a classificação de forma cronometrada. Era feito então a filtragem do material dos tubos em um filtro de membrana, enxaguando do tubo pelo menos duas vezes, com a seringa repleta de soro fisiológico 0,9% era feita a lavagem da membrana em cima de uma placa 90mm marcada em colunas.

O rastreio então era feito de forma linear nas colunas e os oócitos consideráveis viáveis passados para uma gota de meio LAV em outra placa (90mm) para limpar sujeiras residuais, na segunda gota era feita a separação, classificação e contagem. Após isso, o veterinário responsável verificava a classificação feita por cada estagiário e conferia as placas de rastreio. Ao final, são tiradas fotos dos oócitos (Figura 37) classificados e feito o relatório, foram obtidos nos treinamentos os resultados mostrados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Relatório geral do treinamento de seleção de oócitos.

Dados	Resultado
N° de ovários	100
Oócitos totais	1400
Oócitos Viáveis	416

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Tabela 5 – Relatório de Clivagem dos oócitos que foram para laboratório.

Dados	Resultados
Estruturas totais	146
Estruturas viáveis	117
Estruturas cultivadas	129
Estruturas clivadas	68
Estruturas clivadas/ oócitos viáveis	58%
Estruturas clivadas/ cultivadas	53%

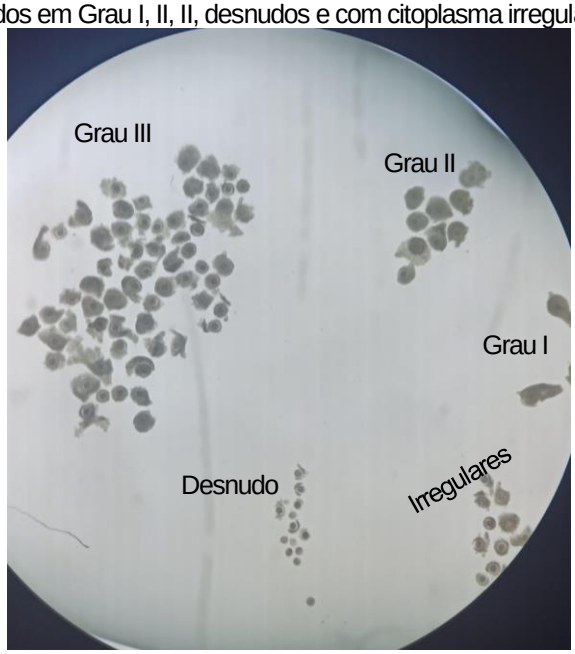
Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Figura 36: Material e equipamento usados no treinamento de seleção de oócitos.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

Figura 37: Oócitos selecionados no dia 27 de setembro de 2021, classificados em Grau I, II, II, desnudos e com citoplasma irregular.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2021

CAPÍTULO 2 - INFLUÊNCIA DO GRAU DE DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO *IN VITRO* NA TAXA DE CONCEPÇÃO EM BOVINOS

Resumo

O desenvolvimento das biotecnologias da reprodução na produção de bovinos cresce de forma rápida com o aparecimento de novas tecnologias e pesquisas. Entre elas é possível citar a produção *in vitro* de embriões que chegou no Brasil em torno de 1970 e alcançou a produção de 304.269 embriões *in vitro* em 2019. Visto o crescimento deste mercado, este estudo buscou relacionar a taxa de concepção com o grau de desenvolvimento de embrião *in vitro* transferido com sete dias de cultivo. Foram obtidos dados de 12.051 embriões transferidos, tendo sido produzidos em diferentes laboratórios, e comparado as taxas de concepção entre os estágios de blastocisto, foi feito o uso da estatística de qui-quadrado (P>0,05) em busca da diferença significativa. A maior taxa de concepção foi dos blastocistos expandidos (BX) e a menor dos blastocistos inicias (BI), houve diferença significativa entre eles e também do BX e blastocisto (BL). Não houve diferença estatística significante entre as demais comparações entre as classes. Os fatores que podem causar essa disparidade é a quantidade de produção de interferon-tau (IFNT) e em pesquisas recentes ainda com poucos estudos começaram a relacionar com a secreção de microRNAs pelos embriões em cada fase. Desta forma, é possível afirmar que o grau de desenvolvimento do embrião transferido influência na taxa de concepção e o blastocisto expandido apresenta melhores taxas de concepção mas não se difere estatisticamente dos embriões em eclosão e eclodidos.

Palavras-Chave: blastocisto, fecundação *in vitro*, biotecnologia, reprodução animal.

1. INTRODUÇÃO

A produção de embriões *in vitro* é um objetivo visado há algum tempo, em 1890 já havia sido descrito a primeira transferência de embrião por Heape utilizando coelhos (GONÇALVES, 2002). No século seguinte, com o desenvolvimento de novos meios de cultura descritos por Wesley Whitten, testado em embriões de ratos (WHITTEN, 1956), houve uma mudança significativa no sucesso de implantação, além de gerar um aumento no desenvolvimento de novas técnicas na área. Na década de 70 a produção *in vitro* de embriões bovinos de forma comercial começou a ser moldada, tendo início nos Estados Unidos e chegou ao Brasil em meados de 1977, com a primeira tentativa de transferência de embrião (TE). Já em 1985 foi criada a Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), que busca difundir informações científicas e estimular a pesquisa na área de produção de embriões (GONÇALVES, 2002).

O crescimento no setor de produção *in vitro* de embriões(PIVE) no Brasil se deu a partir de 2000 (VIANA, 2021) e em 2019 chegou a 304.269 embriões produzidos, contudo esses valores podem estar subestimados pela falta de registro de embriões. Visto isso, é possível afirmar que o uso dessa tecnologia não é mais somente para rebanhos de alto valor genético e pouco acessível, mas começou a ser difundida em pequenos e médios produtores, tanto da área do leite quanto do corte (SILVEIRA; PUGLIESI, 2020).

Um dos valores de referência mais importante para saber o sucesso da produção *in vitro* de embriões é a taxa de concepção após a transferência, e alguns dos fatores que a influenciam é a fase de vida da receptora e se ela se encontra em lactação, a época do ano LOBATO et al, 2019), o grau de desenvolvimento do embrião e a sincronia dele com a fêmea receptora (KUBISCH et al.,2004; GONELLA-DIAZA et al., 2013; TALUKDER et al., 2018).

Os últimos dois fatores citados estão relacionados por conta da liberação de elementos responsáveis pelo reconhecimento materno, como por exemplo o interferon-tau (IFNT) e de outras moléculas presentes nas vesículas extracelulares secretadas pelo embrião e por células do sistema reprodutivo da fêmea (BRIDI,2020)

Considerando as informações supracitadas, o presente trabalho tem como objetivo apresentar a influência do grau de desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* sobre a taxa de concepção, diagnosticada 30 dias após a TE, utilizando a estatística de qui-quadrado (P>0,05) para análise da diferença, a fim de buscar a maximização da produção nesse setor que está em rápido crescimento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

2.1.1. Ovulação

O ciclo estral das fêmeas é iniciado na puberdade, no caso de fêmeas bovinas entre 8 a 18 meses, tendo esse intervalo grande por conta da influência de raça, alimentação, época

do ano e presença de macho. Esse ciclo é dividido em proestro, estro, metaestro, diestro e anestro, sendo eles coordenados por hormônios que em suas oscilações ditam cada etapa e fazem parte do eixo-hipotálamo-hipófise-gonadal, os principais são o GnRH (Hormônio liberador de gonadotrofina), LH (hormônio luteinizante), FSH (hormônio folículo estimulante), ocitocina, estrógeno, prostaglandina e progesterona (KLEIN, 2014).

Na fase de proestro o corpo lúteo que está secretando progesterona começa a regredir pela liberação de prostaglandina ($PGF_{2\alpha}$) pelo útero após 14 dias da ovulação, caso não tenha acontecido a fertilização. E pela diminuição da taxa de progesterona após a luteólise, os folículos estimulados pelo FSH conseguem manter seu desenvolvimento até um deles se tornar o folículo dominante, que pela inibina faz um *feedback* negativo para o FSH. É iniciada então a fase de estro, ou cio, onde há maior produção de estrogênio pelas células da granulosa do folículo, levando aos sinais de recepção sexual, e aumento dos receptores de LH nas células da teca interna (REECE *et al.,* 2017)

Nos bovinos, o estro dura em média de 12h a 16h, contudo a ovulação acontece apenas de 10h a 12h após essa fase. O pico de LH acontece no início do estro, causado pelo aumento de estradiol liberado pelo folículo que faz *feedback* positivo para o hipotálamo liberando GnRH (GORDON, 2003), e leva ao estímulo de meiose para o oócito e para que as células da granulosa passem a ser tecido lúteo e liberem progesterona, além disso estimula a liberação de enzimas hidrolíticas na teca que causam a dissociação do tecido conjuntivo do folículo, causando a ovulação propriamente dita (KLEIN, 2014).

2.1.2. Fertilização

Após a liberação do oócito na ovulação, o corpo lúteo começa a se formar pelas células da granulosa remanescentes do folículo, sendo continuamente estimulado pelo LH, essa é a fase de metaestro (HYTTEL *et al.,* 2012*)*. Pelas fímbrias o oócito é levado até a tuba uterina, já tendo passado pela primeira fase meiótica, onde irá encontrar os espermatozoides viáveis para a fecundação. Esses gametas masculinos, só realizam a fecundação se tiverem passado pelo processo de capacitação, após terem sido ejaculados dentro da vagina (KLEIN, 2014).

Esse processo que os espermatozoides devem passar demora algumas horas, acontece dentro das criptas cervicais, da junção dos cornos uterinos com a tuba (REECE *et al.,* 217) e na ampola (KLEIN, 2014). Esses reservatórios ajudam a manter a sobrevivência

dos gametas, até o final da remoção das glicoproteínas presentes em sua superfície celular, assim permitido que ele estabeleça canais para a liberação de hialuronidase e enzima proteolítica que farão a degradação da zona pelúcida do oócito, que juntamente com a motilidade, irá permitir a fecundação (REECE *et al.,* 2017).

Ao passar as barreiras do oócito (corona radiata, zona pelúcida e membrana vitelina) é iniciado a reação de bloqueio vitelino que impede a entrada de outro espermatozoide, a fim de evitar a polispermia e inviabilizar o zigoto, e a passagem para a segunda fase meiótica do oócito. É feito então a fusão dos pro-núcleos e formando consequentemente o zigoto, uma célula diploide (2n). (GHOSH, 2013).

2.1.3. Fase germinativa

O zigoto formado realiza sua primeira clivagem, primeira mitose, dividindo-se em duas células denominadas blastômeros em torno de 24h após a ovulação. As divisões mitóticas então são continuadas sem haver o crescimento celular e permanecendo envolvida pela zona pelúcida, e ao alcançar 8 células para os bovinos é feita a ativação principal do genoma (HYTTEL *et al.,* 2012*)*.

O estágio de mórula é composto de 12 a 16 células clivadas, sem haver formação de cavidade interna, apenas uma massa de células. Essa formação ocorre de 3 a 4 dias após a fecundação, durante a passagem pela tuba uterina, saindo da ampola até o útero com auxílio dos cílios, mucosas e contrações (GHOSH, 2013). A formação do blastocisto inicial ocorre quando é formada uma cavidade com fluído (blastocele) dentro da mórula, de 6 a 8 dias após a fecundação, podendo acontecer antes de chegar no útero (REECE *et al.,* 2017).

. O tempo que leva nessa passagem é importante para que o útero esteja preparado para a chegada do embrião, feita a limpeza uterina dos resquícios de sêmen e estimulado as células do endométrio, por meio da progesterona liberado pelo CL (corpo lúteo), a secreção de um meio nutritivo para o desenvolvimento embrionário (KLEIN, 2014). Não apenas isso é importante para que o embrião se mantenha e desenvolva-se, a interação entre o embrião e a fêmea é crucial para a sobrevivência dele.

Na pesquisa desenvolvida por Talukeder e *et al.* (2018), ainda no oviduto os embriões com 16 células iniciam a liberação de interferon-tau (IFN_T) que ajuda a suprimir o sistema imunológico, evitando assim uma resposta inflamatória que poderia afetar o embrião. Outra

forma de manutenção da gestação ocorre na supressão da liberação de prostaglandina uterina ($PFG_{2\alpha}$) pelo embrião, evitando assim a luteólise precoce (KLEIN, 2014), isso também ocorre por conta do IFN_T que inibe a transcrição do receptor de estrógeno (ESR1) e consequentemente o e ocitocina (OXTR) que são essenciais para iniciar a cascata de liberação da $PFG_{2\alpha}$ (SPENCER; BAZER, 1996)

Já no corpo uterino, mas anterior a implantação, o blastocisto continua se desenvolvendo, sendo composto pelas estruturas da zona pelúcida, trofectoderme, a blastocele e a massa celular interna (MCI), sendo essa última composta pelos blastômeros internos. A blastocele ao longo do amadurecimento é preenchida com fluído, criando uma maior pressão osmótica que leva a expansão do blastocisto (HYTTEL *et al.,* 2012*)*. Dessa forma que é possível classificar em blastocisto inicial, quando é iniciada a formação da blastocele e ocupa menos de 50% da estrutura, blastocisto, quando o tamanho da blastocele se torna proporcional ao tamanho da MCI, blastocisto expandido, quando a blastocele se torna maior que a MCI e ocupa a maior parte do espaço perivitelínico e deixando a zona pelúcida com menor espessura, e por fim, pela pressão é iniciada a eclosão, formando o blastocisto em eclosão e o eclodido posteriormente a total liberação da zona pelúcida (VIANA, 2009).

2.1.4. Fase embrionária

Com a eclosão do embrião a região do MCI já passou por uma diferenciação, formando duas camadas distintas de células, uma achatada que circunda a blastocele denominada hipoblasto, e a outra que é remanescente que é a epiblasto. As células que compõem o trofectoderma, região que recobre o epiblasto (camada de Rauber), é desintegrado, permitindo que o embrião tenha contato direto com a parede uterina, nessa fase o epiblasto e o hipoblasto formam o disco embrionário. (HYTTEL *et al.,* 2012).

Com o crescimento contínuo do embrião, é preciso um maior aporte nutritivo, dessa forma ele cria membranas e inicia a implantação no endométrio para obter nutrição do sistema vascular da fêmea (EURELL, 2012). No caso dos bovinos essa implantação não é tão profunda no endométrio e é feita dentro de protrusões endometriais denominadas carúnculas, e é iniciada de 25 a 30 dias em média após a fecundação. (KLEIN, 2014)

Após a implantação, é começado o processo de placentação, ou seja, o desenvolvimento das membranas extraembrionárias. São formados então o cório, alantoide e

o âmnio, nos ruminantes ainda há a presença dos cotilédones que se fixam as carúnculas maternas criando o complexo placentoma. O córion é a membrana mais externa que possui contato direto com o endométrio, já a membrana alantoide possui parte externa (em contato com o cório) e parte interna (em contato com o âmnio), criando entre elas a cavidade alantoide. Por fim, a membrana do âmnio é a mais interna, que cria a cavidade amniótica onde o feto ficará até o momento do parto (REECE *et al.,* 2017).

O embrião inicia a gastrulação quando o epiblasto forma a linha primitiva, a partir dela é formada as células que vão criar os tecidos do endoderma, mesoderma e células germinativas primordiais, precedentes dos oócitos e espermatozoides. A ectoderme é proveniente do epiblasto remanescente, que originará o sistema nervoso central (HYTTEL *et al.,* 2012).

2.2. PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO* (PIVE)

A produção *in vitro* de embriões é uma biotecnologia em crescente expansão no Brasil e com o desenvolvimento de novas pesquisas o resultado obtido de conversão de oócitos viáveis em embriões de qualidade tem aumentando significativamente, tornando esse procedimento mais rentável ao produtor que busca melhorar a qualidade genética do seu rebanho. Para alcançar bons resultados há uma grande quantidade de variáveis que podem interferir, cada etapa da produção pode influenciar na quantidade final de embriões produzidos (VIANA,2021).

A primeira etapa desse processo é a aspiração folicular das vacas doadoras, previamente escolhidas geralmente pelo seu valor genético. Em seguida, os oócitos aspirados são levados ao laboratório onde passam pela maturação *in vitro*, sendo essa etapa feita para prepará-los para a próxima que é a fertilização *in vitro*, na qual o sêmen dos touros escolhidos é colocado junto com os oócitos, no cultivo *in vitro* as estruturas fecundadas são nutridas até chegarem a fase de blastocisto. A última etapa é a transferência deles para as fêmeas receptoras, que foram previamente sincronizadas para receber esses embriões e levar adiante a prenhez (GORDON,2003).

A confirmação da concepção das fêmeas é feita 30 dias após a transferência, sendo feito por meio de palpação transretal auxiliada ou não por ultrassonografia. A média de

concepção utilizando embriões *in vitro* em bovino da raça nelore é de 37,4% (Pontes et al. 2009), sendo essa raça a mais utilizada para corte no Brasil.

2.2.1. Aspiração folicular (OPU- Ovum pick up)

A aspiração folicular atualmente é realizada através de uma guia com transdutor de ultrassom em via transvaginal, sendo feito juntamente com um apoio transretal para fixação do ovário durante a punção. Primeiramente é feita a escolha das doadoras, podendo ou não realizar a sincronização de onda folicular e coletar no início da onda, a fim de evitar que um folículo dominante cause diminuição da qualidade dos demais oócitos (GONÇALVES *et al.,* 2002).

O animal então é devidamente contido e é feita a anestesia epidural (espaço sacrococcígeo) com cloridrato de lidocaína, de 2ml a 4ml, sendo que em novilhas pode se usar doses ainda mais baixas. É feita a limpeza externa da vulva com água e sabão e então introduzida a guia com o transdutor (geralmente 7,5MHz) na vagina, e com a outra mão é feita a tração do ovário por via transretal. Com uma agulha de 18G ou 19G acoplada e descartável, é feita a introdução e punção dos folículos com o auxílio do ultrassom, o líquido coletado é levado por um sistema fechado com bomba (90 mmHg) até o tubo de 50ml com a solução de escolha (soro fisiológico e antibiótico, soro DPBS com heparina e soro fetal bovino, ou soro fisiológico com soro fetal bovino, dentre outros) (OLIVEIRA, 2014)

Na aspiração folicular, a idade das doadoras (MERTON et al., 2003), a nutrição (OLIVEIRA et al., 2002), raça (CRUZ *et al.,* 2009), estresse térmico (FERREIRA *et al., 2011)*, experiência do aspirador (SCOTT et al., 1994), o calibre da agulha usada (BOLS et al., 2004). e até mesmo a pressão da bomba de vácuo pode influenciar na qualidade dos oócitos coletados (HASHIMOTO et al., 1999)

2.2.2. Maturação *in vitro*

O processo de maturação *in vitro* tenta reproduzir o que acontece com os oócitos bovinos antes da ovulação dentro do folículo da fêmea viva, no qual ele passa da fase de prófase I (divisão meiótica) para metáfase II, levando a uma mudança na organização de todo

seu citoplasma e a quebra da vesícula germinativa, no caso *in vivo* esse processo é estimulado pelo pico de LH (HYTTEL *et al.,* 2012), o período para que aconteça esse processo de maturação varia de 18 a 24 horas (MERTON *ET AL.,* 2003).

Essa etapa acontece após seleção dos oócitos aspirados, eles são colocados em tubos contendo um meio de maturação, podendo ser simples ou complexo. Os meios simples são sistemas geralmente tamponados com bicarbonato, soro fisiológico, piruvato, lactato, glicose, soro ou albumina de soro bovino (BSA) e antibiótico de amplo espectro e destituído de toxicidade. Já os meios complexos além dos componentes do meio simples possuem adição de vitamina, purinas, aminoácidos e outros (GORDON,2003)

Atualmente o meio base mais utilizado para a maturação é o *Tissue culture medium 199* (TCM-199), sendo ele tamponado com bicarbonato ou HEPES (Ácido Hidroxi-Etil-Piperazina-Etano-Sulfônico), composto por vários soros e/ou gonadotrofina e/ou hormônios estereóides. Outros fatores também influenciam na maturação *in vitro,* como a osmolaridade, que deve ser isotônica, a fim de simular o ambiente com fluidos naturais que estaria *in vivo*, o p.H., exposição ao ar ou atmosfera rica em gás carbônico (CO_2) e temperatura. (GORDON,2003)

Ademais, as células *cumulus* possuem papel importante nesse processo, sendo classificados oócitos de melhor qualidade aqueles com maior quantidade dessas células, que vão nutrir e estimular as mudanças necessárias para que esse gameta esteja pronto para a fecundação. Esse revestimento de células também se expande e forma uma camada solta, dessa forma as células ficam em contato com uma matriz de ácido hialurônico (HYTTEL *et al.,* 2012).

2.2.3. Fertilização *in vitro*

Após passarem pela fase de maturação os oócitos são preparados para a fertilização, sendo colocados em um novo meio que facilite a criação de um ambiente em que a fecundação seja a mais breve possível. Um dos meios de fertilização que pode ser usado é o TALP (Tyrodes-Albumina-Lactato- Piruvato), que possui bicarbonato, BSA, sódio lactato, sódio de piruvato e heparina, esse é o meio mais utilizado em laboratórios de FIV. Outro que pode ser usado é o mSOF (Synthetic Oviductal Fluid), tendo a possibilidade de ser complementado

com os ácidos amino essenciais e não essenciais, glutamina, glicina e/ou piruvato (GORDON, 2003).

Na fertilização em laboratório na produção de bovinos, é mais usual a utilização de sêmen congelado, dessa forma, após o descongelamento é preciso realizar etapas para selecionar os espermatozoides viáveis. A técnica mais utilizada é o uso do gradiente de Percoll®, no qual é feita em um recipiente uma solução de concentração á 45%, sob uma de concentração de 90%, o sêmen congelado é colocado nessa solução e passa por uma centrifugação, pela densidade e motilidade é feita a separação dos espermatozoides, formando um pellet no fundo do recipiente com os viáveis. O sobrenadante, composto pelos inviáveis e diluentes, é removido e descartado (GONÇALVES *et al.,* 2002)

A capacitação espermática também deve ser realizada *in vitro*, uma vez que *in vivo* acontece dentro dos reservatórios espermáticos do trato reprodutivo da fêmea, no qual são removidas glicoproteínas presentes em sua superfície celular dos espermatozoides. As substâncias usadas para esse processo são adicionadas geralmente no meio de fertilização, como a heparina, sendo complementada com outras que melhoram também a motilidade espermática, como penicilina, hipotaurina e epinefrina (HYTTEL *et al.,* 2012).

Após adicionado os espermatozoides a placa de petri contendo as microgotas de meio de fertilização com os oócitos maduros, é esperado em torno 20 horas até o final do processo de fertilização. A qualidade do sêmen e dos oócitos, a variação individual de cada touro, a interação touro-vaca, temperatura, a pressão dos gases CO_2 e O_2 e estresse oxidativo podem afetar na formação ou não de um zigoto e na sua qualidade futura como blastocisto. (GORDON, 2003).

2.2.4. Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* é iniciado após a finalização do período da fertilização, com a geração dos zigotos, e se estende por 7 dias em que ao final é formado os blastocistos em diferentes graus de desenvolvimento que podem ser transferidos intravaginal até o corno uterino da fêmea que prosseguira com a gestação. O meio de cultivo utilizado busca se aproximar ao máximo do ambiente da tuba uterina, que é onde no em *in vivo* a fertilização acontece e inicia o desenvolvimento do embrião (KLEIN, 2014).

Entre os meios mais usados está o SOF (*Synthetic oviductal fluid*) que ao longo do tempo foi aperfeiçoado e adicionado aminoácidos provenientes da BSA e/ou SFB em sua composição, contudo ainda há bastantes pesquisas para se desenvolver um meio com menor probabilidade de causar anormalidades durante o desenvolvimento do embrião (GORDON,2003)

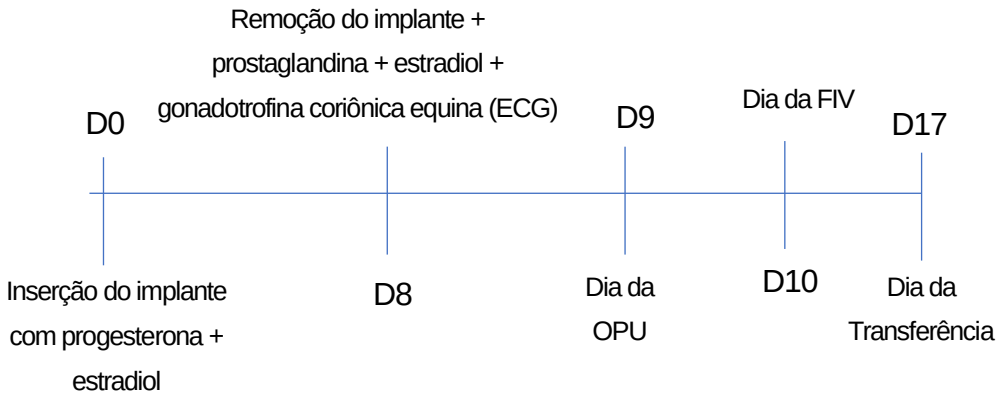
O estresse oxidativo causado pela alta tensão de oxigênio é um dos fatores que afeta negativamente o desenvolvimento embrionário, uma vez que causa lesões no DNA pela liberação do peróxido de hidrogênio. Uma das formas de se diminuir isso é adicionar ou manter no meio de cultivo as células de cúmulos da FIV, evitar a exposição a luz, usar antioxidante no meio de cultivo e reduzir a tensão de O_2 na estufa onde ocorre o cultivo (SILVA *et al.,*2010)

No dia 7 após a FIV é feita a classificação dos embriões que serão envasados e levados para a transferência ou criopreservados, pelo método da vitrificação ou DT (*Direct Transfer*). Eles podem ser classificados em: blastocisto inicial, quando a blastocele ainda está em desenvolvimento e ocupa pouco espaço na cavidade perivitelino; blastocisto, quando a MCI está mais compacta e a blastocele está mais proporcional ao espaço ocupado em relação ao embrião; blastocisto expandido, quando a blastocele ocupa a maior parte da cavidade, aumentando o tamanho do embrião e deixando a zona pelúcida menos espessa; blastocisto em eclosão, quando é iniciada a saída da zona pelúcida; e por fim, blastocisto eclodido, o estágio mais avançado onde ele está se preparando já para a implantação e não é mais encoberto pela zona pelúcida (VIANA, 2009).

2.2.5. Transferência de Embrião em Tempo Fixo (TETF)

Para a transferência dos embriões as receptoras precisam passar antes por um protocolo hormonal para estarem aptas a receber os embriões, dessa forma é feito de forma parecida com o IATF (Inseminação Artificial em Tempo Fixo), contudo no dia que seria feita a inseminação é quando é feita a fertilização *in vitro*. Na Figura 38 a seguir é possível ver a linha do tempo da TETF (COLOMBO,2016). Outros protocolos hormonais podem ser feitos de acordo com a necessidade de cada produção, e a cada dia surgem novas pesquisas sobre a eficiência dos diferentes protocolos.

Figura 38: Cronologia do protocolo de TETF feito por Colombo (2016) em vacas da raça nelore.



Fonte: Adaptado de Colombo (2016).

No D0 o uso de progesterona e estradiol simula a primeira onda folicular, no qual acontece ainda com a presença de um corpo lúteo e dessa forma há regressão dos folículos. No D8 com a remoção do implante e o uso da prostaglandina aqueles animais com um corpo lúteo presente sofrem a luteólise, o uso do estradiol com a ECG há estímulo para um novo recrutamento folicular e desenvolvimento dos mesmos (KLEIN, 2014).

Assim é feita a sincronização simulando o ciclo natural das fêmeas para que todas tenham uma ovulação até o dia D10 e tenham um corpo lúteo viável com boa liberação de progesterona no D17 para manter a prenhez do embrião.

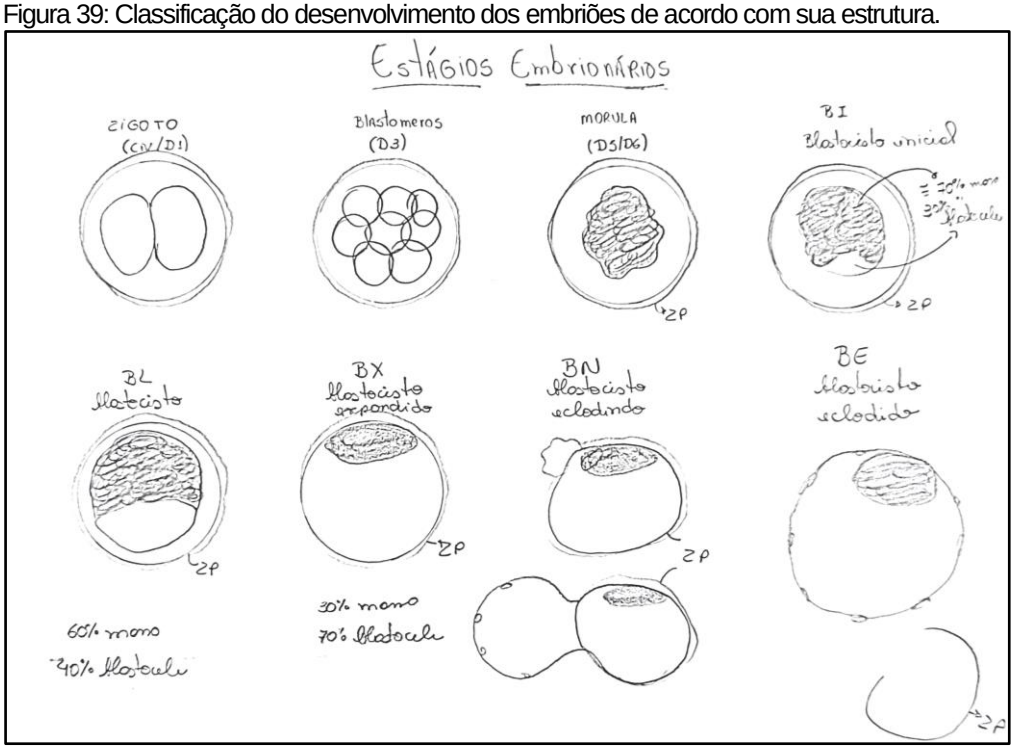
3. METODOLOGIA

No presente trabalho, os dados foram coletados utilizando o sistema de controle e gerenciamento da empresa, o NetBovino®. Sendo obtido os resultados das taxas de concepções, avaliadas trinta dias após a transferência de embrião, de produções realizadas no período de 01/01/2000 até 16/11/2021 de acordo com a classe de embrião que foi transferida e do dia da transferência, sendo escolhido apenas os transferidos no 7° dia do cultivo embrionário.

Os embriões foram produzidos pelo próprio laboratório da empresa, que usa um sistema de baixa tensão de O_2 na produção, e de terceirizados, que utilizavam diferentes sistemas, com baixa tensão ou alta tensão de oxigênio. A raça bovina mais utilizada foi a nelore.

A classificação foi feita com base na estrutura do blastocisto (Figura 39): o blastocisto inicial, com um blastocele menor que 50%; o blastocisto, com um blastocele proporcional ao tamanho da massa celular interna (MCI); o blastocisto expandido, com um blastocele maior que a MCI e ocupa a maior parte do espaço perivitelínico; o blastocisto em eclosão, quando pela pressão inicia a saída da zona pelúcida; e por fim, o eclodido, com a total liberação da zona pelúcida.

Figura 39: Classificação do desenvolvimento dos embriões de acordo com sua estrutura.



Fonte: Elaborado e Cedido por Marina Trevisoli

.Para a análise estatística foi utilizado o teste qualitativo de Qui-Quadrado, usando o software JAMOVI®, para o comparativo entre as classificações de embrião sob a taxa de concepção, com significância de 5% (P<0,05).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados obtidos da produção *in vitro* de embriões bovinos do dia 01/01/2020 até 16/11/2021 que foram transferidos no 7° dia de desenvolvimento e confirmada a concepção após 30 dias da TE (transferência de embrião) são apresentados na Tabela 6 e na Figura 40. Foram transferidos total de 12.051 embriões, sendo 64% blastocistos expandidos (BX) e os

restantes distribuídos pelas classes de blastocisto inicial (8%), blastocisto (23%), blastocisto em eclosão (3%) e blastocisto eclodido (2%).

No comparativo estatístico houve diferença significativa da taxa de concepção da classe BX (42%) entre a BI (38%) e BL (39%), contudo, não houve diferença estatística significante entre BI, BL, BN (41%) e BE (39%). Por outro lado, quando analisado o grau de blastocisto expandido, em eclosão e eclodido não houve diferença estatística.

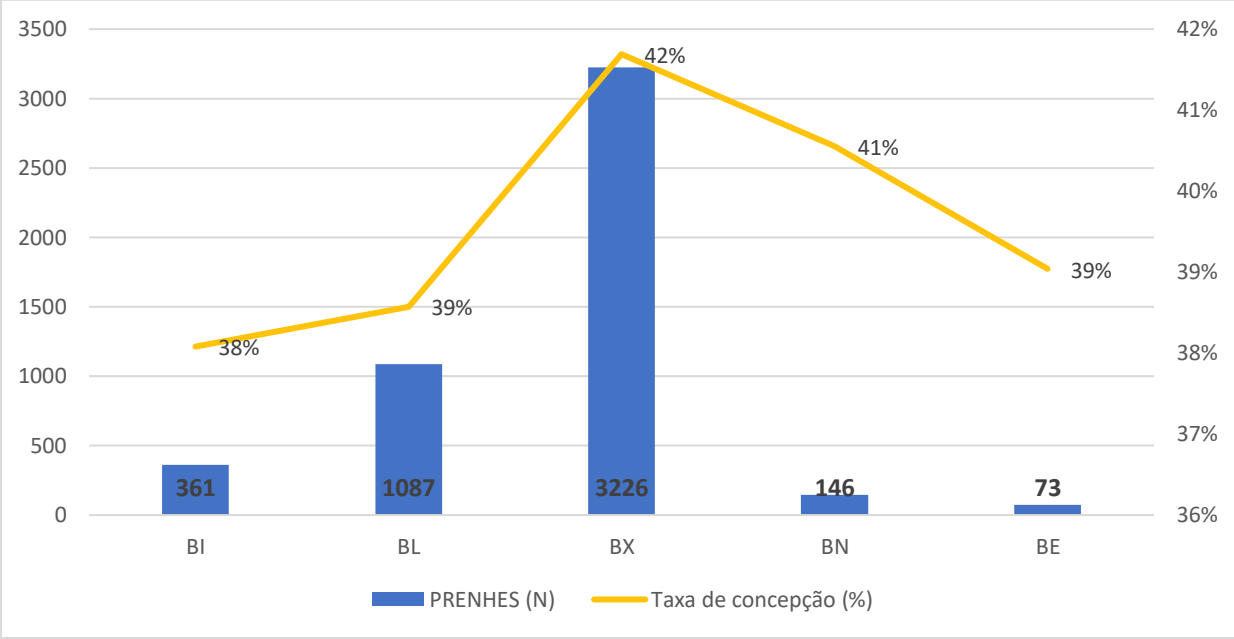
Tabela 6- Quantidade e percentual (%) de fêmeas prenhas de acordo com a classe de embriões produzidos *in vitro* e transferidos com 7 dias de desenvolvimento.

CLASSE	**PRENHES (%)**	**TOTAL DE TRANSFERÊNCIAS**
BI	361 (38%) ^{A}	948
BL	1087 (39%) ^{A}	2818
BX	3226 (42%) ^{B}	7738
BN	146 (41%) ^{AB}	360
BE	73 (39%) ^{AB}	187
TOTAL	**4893 (41%)**	**12051**

*(BI) blastocisto inicial, (BL) blastocisto, (BX) blastocisto expandido (BN) blastocisto em eclosão e (BE) blastocisto eclodindo.**Letras iguais na mesma coluna não indica diferença significativa, (P<0,05), teste Qui-quadrado.

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Figura 40- Quantidade de prenhes e taxa de concepção (%) de acordo com a classe de embriões produzidos *in vitro* e transferidos com 7 dias de desenvolvimento.



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Na pesquisa realizada por Florentino (2011), foram feitas 5403 transferências e obtido uma taxa de prenhez de 34,33%, tendo o estágio embrionário com a maior taxa o BX (38,2%) tal igual o presente trabalho que obteve 42% nesse estágio. Na estatística, no entanto houve discordância em relação ao BI e BL, que como mostrado na tabela 1 não houve diferença estatística significante, mas na pesquisa de Florentino (2011) eles apresentam diferença, um dos fatores que pode levar a esse desacordo é a menor quantidade de BI transferido em relação aos BL.

Em outros trabalhos também foi obtido que o grau de desenvolvimento embrionário com a maior taxa de concepção é o BX (OLIVEIRA et al., 2017; COCHITO, 2013; ORTLIBAS *et al.*, 2015; MELLO, 2003; COLOMBO *et al.*, 2010; GONELLA-DIAZA *et al.*, 2013). Contudo, nas diferenças estatísticas de alguns autores (OLIVEIRA *et al., 2017*; MELLO, 2003) não houve concordância com o atual trabalho em relação ao estágio de BX e BL, tendo sido obtido diferença significativa entre eles.

Quando utilizada a estatística de regressão lógica por Gonella-Diaza *et al.* (2013) foram obtidos as taxas de concepção de 21,33% para BI, 28,83% para BL, 37,04% para BX, 31,56% para BN e 30,43% para BE, tendo como valor total 16.685 animais prenhes. Tanto no presente estudo quanto neste citado, o estágio de BL, BN e BE não possuem diferença estatística significativa, mas os trabalhos divergem nos demais comparativos. Em outro estudo usando também a regressão lógica, por Colombo *et al.* (2010), não houve diferença significativa entre o BX, BL e BI, todavia o número de animais utilizados foi bem menor (1.590 receptoras) do que o feito por Gonella-Diaza *et al.* (2013) (16.685 receptoras).

Um dos fatores que está associado a uma melhor taxa de concepção em blastocisto com um grau de desenvolvimento maior é a produção de interferon-tau (IFNT) por ele. Em pesquisas antigas como de Hernandez-Ledezma *et al.* (1993) e Kubisch *et al.* (1998) já era analisado a relação da secreção dessa cadeia de aminoácidos com a idade dos blastocistos, mostrando que quanto mais avançados maior a quantidade produzida. A importância dessa proteína é por sua ação de inibir a liberação de $PFG_{2\alpha}$ pelo útero, que causaria a luteólise (SPENCER; BAZER, 1996) e por uma supressão do sistema imune da fêmea, regulando citocinas anti-inflamatórias, que evita a rejeição do embrião (RASHID, 2018).

No estudo feito por Kubisch *et al*. (2004), foi analisado também a taxa de prenhez em relação ao grau de desenvolvimento do embrião e a secreção de IFN_T, sendo visto que os blastocistos expandidos possuíram a maior taxa e maior concentração liberada dessa proteína, aumentando significativamente a probabilidade de prenhez. Contudo, neste mesmo trabalho

os blastocistos (BL) dentro do seu próprio grupo mostraram o oposto, aqueles com menor secreção de IFN_T foram os que apresentaram maior taxa de prenhez.

Em pesquisas mais recentes está sendo discutido a importância dos microRNAs no desenvolvimento embrionário *in vitro* e *in vivo* e como isso pode afetar a viabilidade dele na TE (transferência embrionária), uma vez que os embriões secretam vesículas extracelulares (EVs), contendo esses RNAs endógeno, importantes para a transmissão de informações entre o embrião e a fêmea receptora (MELLISHO, 2019), contudo ainda há necessidade de mais estudos sobre o assunto, havendo ainda falta de muitas informações.

No estudo de Melo-Baez *et al. (*2020) os embriões em estágio de mórula possuem uma liberação maior e com tamanho superior de EVs do que aqueles em estágio de blastocisto e a composição dessas vesículas varia de acordo com a qualidade do embrião. O conhecimento mais aprofundado dos microRNAs em cada grau de desenvolvimento pode ajudar a encontrar biomarcadores de forma menos invasiva para definir a qualidade embrionária e consequentemente melhor a taxa de concepção.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, é possível afirmar o grau de desenvolvimento do embrião transferido influencia na taxa de concepção, pois apresentam diferença estatística significante (P>0,05), e o blastocisto expandido apresenta melhores taxas de concepção mas não se difere estatisticamente dos embriões em eclosão e eclodidos. Contudo ainda é preciso o desenvolvimento de mais pesquisas para definir possíveis fatores que levam à essa diferença.

6. REFEREÊNCIAS

BOLS, P. E. J.; LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; VAN SOOM, A. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. **Theriogenology**, v. 62, p. 906-914, 2004.

BRIDI, Alessandra; PERECIN, Felipe; SILVEIRA, Juliano Coelho Da. Extracellular Vesicles Mediated Early Embryo–Maternal Interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, no. 3: 1163, 2020, DOI:10.3390/ijms21031163.

COCHITO, C. S. **Influência dos protocolos hormonais de receptoras e do estágio de desenvolvimento de embriões PIV da Gir (Bos taurus indicus) sobre as taxas de gestação.** 2013. 61f. Dissertação (Mestrado em Clínica e Reprodução Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 2013.

COLOMBO, A. H. B.; ZANIBONI, L.; CAVALIERI, F. L. B.; RIGOLON, L. P. Estimação dos fatores que interferem diretamente e indiretamente nos resultados da fecundação *in vitro* (FIV). In: V MOSTRA INTERNA DE TRABALHOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2010, Maringá. **Anais[**...] Maringá: V Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica / CESUMAR, 2010. ISBN 978-85-61091-69-9.

COLOMBO, Antônio Hugo Bezerra. **Avaliação De Biotécnicas Da Reprodução Animal Sob O Foco Ambiental**. 2016. 40f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Limpas) - Unicesumar – Centro Universitário de Maringá. Maringá-PR, 2016.

CRUZ, Fabiano Buss; MARTINS, Leonardo Tondello; MARINHO, Luciana Simões Rafagnin; FORELL, Fabiana; VIEIRA, Arnaldo Diniz; MEZZALIRA, Alceu. Aspiração folicular em vacas Bos taurus e Bos indicus e vitrificação dos oócitos em condições de campo. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages, v.8, n.2, p. 184-187, 2009

EURELL, Jo Ann., FRAPPIER, Brian L. **Histologia veterinária de Dellmann**. 6. ed. Barueri, SP: Manole, 2012.

FERREIRA, R.M.; AYRES H.; CHIARATTI, M.R.; FERRAZ, M.L., ARAÚJO, A.B.; RODRIGUES, C.A.; WATANABE, Y.F.; VIREQUE, A.A.; JOAQUIM, D.C., SMITH, L.C., MEIRELLES F.V.; BARUSELLI, P.S. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. **Journal Dairy Science**, v.94, p.2383-2392, 2011.

FLORENTINO, Christiane Medeiros. **Fatores que influenciam no sucesso da produção *in vitro* de embriões em receptoras bovinas criadas na região da Amazônia legal.** 2011. Tese (Doutora em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

GHOSH, Ranajit Kumar. **Essentials of Veterinary: Histology & Embriology**. 2.ed. Kolkata: Current Books International, 2013.
GONÇALVES, Paulo Bayarddias; FIGUEIREDO, José Ricardo de; FREITAS, Vicente José de Figueiredo. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**.1. ed. São Paulo: Varela, 2002. 340 p.

GONELLA-DIAZA, A.M.; HOLGUÍN, G.; MONTAÑA, D.; VALBUENA, D. Corpus luteum diameter and embryo developmental stage are associated with pregnancy rate: data analysis from 17,521 embryo transfers from a commercial *in vitro* bovine embryo production program. **Animal Reproduction**, Colombia, v.10, n.2, p.106-111, Apr. /Jun. 2013.
GORDON, Ian R. **Laboratory production of cattle embryos.** 2.ed. London: CABI Publishing, 2003. DOI:10.1079/9780851996660.0000.

HASHIMOTO, S.; TAKAKURA, R.; KISHI, M.; SUDO, T.; MINAMI, N.; YAMADA, M. Ultrasound-guided follicle aspiration: the collection of bovine *cumulus*-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. **Theriogenology,** v. 51, p. 757-765, 1999

HERNANDEZ-LEDEZMA, Jose Juan; MATHIALAGAN, Nagappan; VILLANUEVA, Cesar; SIKES, John D.; ROBERTS, R. Michael**.** Expression of Vitro-Derived Bovine Trophoblast Interferons by In Blastocysts Is Correlated With Their Morphological Quality and Stage of Development. **Molecular Reproduction And Development**, Missouri, v. 36, p. 1-6, 1993.

HYTTEL, Poul; SINOWATZ, Fred; VEJLSTED, Morten**. Embriologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 455p. ISBN 978-85-3525195-1.

KLEIN, Bradley G. **Cunningham tratado de fisiologia veterinária**.5. ed. Rio de Janeiro :Elsevier, 2014.

KUBISCH, H.M.; LARSON, M.A.; BOBERTS, R.M. Relationship between age of blastocyst formation and interferon-t secretion by *in vitro*-derived bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.49, p.254-260, 1998.

KUBISCH, H.M.; SIRISATHIEN, S.; BOSCH, P.; HERNANDEZ-FONSECA, H.J.; CLEMENTS, G.; LIUKKONEN, J.R.; BRACKETT, B.G. Effects of developmental stage, embryonic interferon-s secretion and recipiente Synchrony on pregnancy rate after transfer of *in vitro* produced Bovine blastocysts. **Reproduction domestic animals,** Berlin, v.39, p. 120–124, 2004, issn 0936-6768.

LOBATO, Melissa defensor; MARQUES, Flávio Luiz Alves; SOARES, Mayara Mafra; FARIA, Ana Cláudia Fagundes; CADIMA, Gustavo Pereira; SANTOS, Ricarda Maria dos. Fatores que influenciam a taxa de concepção e perda gestacional de embriões produzidos *in vitro* na raça girolando**. Ciência animal**, v.29, n.3, p.50- 58, 2019.

MELLISHO, Edwin A; BRIONES, Mario A; VELÁSQUEZ, Alejandra E; CABEZAS, Joel; CASTRO, Fidel O; RODRÍGUEZ-ÁLVAREZ, Lleretny. Extracellular vesicles secreted during blastulation show viability of bovine embryos**. Reproduction,** Chile, v.158, 2019, p. 477–492.
MELLO, V.F. **Influência da receptora e do embrião sobre a viabilidade embrionária e sexo determinados através da ultra-sonografia**. 2003. 104f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MELO-BAEZ, Bárbara; WONG, Yat S.; AGUILERA, Constanza J.; CABEZAS, Joel; MANÇANARES, Ana C. F.; RIADI, Gonzalo; CASTRO, Fidel O.; RODRIGUEZ-ALVAREZ, Lleretny. MicroRNAs from Extracellular Vesicles Secreted by Bovine Embryos as Early Biomarkers of Developmental Competence**. International Journal o f Molecular Sciences.** 2020, DOI:10.3390/ijms21238888.

MERTON, J.S.; ROOS, A. P.W. de; MULLAART, E.; RUIGH, L. de; KAAL, L.; VOS, P. L. A. M, DIELEMAN, S.J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology,** v. 59, p. 651-674, 2003. DOI: 10.1016/s0093-691x (02)01246-3.

OLIVEIRA, Bruno Mello; MENDES, Frederico Cunha; JÚNIOR, José Olavo Borges Mendes; IGARASI, Maurício Scoton; MARTIN Ian. Effect of embryonic phase on pregnancy rate in embryo recitpient cows. **Veterinária Notícias**. v. 23.n. 2. p.7-15. Maio/dez, Uberlândia MG, 2017.

OLIVEIRA, Clara Slade. Biotécnicas da reprodução em bovinos: minicursos ministrados durante o 3º Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em Bovinos” no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica / Clara Slade Oliveira, Raquel Varela Serapião e Carolina Capobiango Romano Quintão. – Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, 2014. 52 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 175).

OLIVEIRA, J. F.; NEVES, J. P.; MORAES, J. C.; GONCALVES, P. B.; BAHR, J. M.; HERNANDEZ, A. G.; COSTA, L. F. Follicular development and steroid concentrations in cows with different levels of fertility raised under nutritional stress. **Animal Reproduction Science**, v. 73, p. 1-10, 2002.

ORTLIBAS, B. A.; MUNIZ, G. B.; NETTO, H. A.; PRADO, R. B.; ATIQUE, T. S. C.; MONTEIRO, F. M.; OLIVEIRA, L. Z. Proporção sexual de embriões bovinos PIV 60D após TETF de acordo com o estágio de desenvolvimento embrionário inovulado. **Boletim de Indústria Animal**, v. 72, n.4, p. 349-355, 2015.

PONTES, JHF 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, p 690-697, 2009.

RASHID, Mohammad B.; TALUKDER, Anup K.; KUSAMA, Kazuya; HANEDA, Shingo; TAKEDOMI, Toshiro; YOSHINO, Hitomi; MORIYASU, Satoru; MATSUI, Motozumi; SHIMADA Masayuki; IMAKAWA, Kazuhiko; MIYAMOTO, Akio. Evidence that interferon-tau secreted from Day-7 embryo in vivo generates anti-inflammatory immune response in the bovine uterus. **Elsevier: Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 500, 12 June 2018, p. 879-884. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.04.178.

REECE, William O. **Dukes: Fisiologia dos animais domésticos**.13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

SCOTT, C. A.; ROBERTSON, L.; DE MOURA, R. T. D.; PATERSON, C.; BOYD, J. S. Technical aspects of transvaginal ultrasound-guided folicular aspiration in cows. **Vet. Rec.,** v. 134, p. 440-443, 1994.

SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; SARAIVA, M. V. A; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J.R. Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo *in vitro* de folículos e embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 233-242, 2010.
SILVEIRA, Juliano coelho da; PUGLIESI, Guilherme. Como inovar no presente sem conhecer o passado?: As primeiras divisões celulares (1991 a 2000). **O embrião**, Jaboticabal, 26 p, fev., 2021.

SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. **Endocrinology**, v.137, n.3, p.1144-1147, 1996. DOI: 10.1210/endo.137.3.8603586.

TALUKDER, Anup K.; RASHID, Mohammad B.; YOUSEF, Mohamed S.; KUSAMA, Kazuya; SHIMIZU, Takashi; SHIMADA, Masayuki; SUAREZ, Susan S.; IMAKAWA, Kazuhiko; MIYAMOTO, Akio. Oviduct epithelium induces interferon-tau in bovine Day-4 embryos, which generates an antiinflammatory response in imune cells. **ScientiFic Reports**, Maio, 2018, DOI: 10.1038/s41598-018-26224-8.

VIANA, João Henrique Moreira. Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo. **Embrapa Gado De Leite: Comunicado técnico 59**. Juiz de Fora, Novembro, 2009. ISSN 1678-3131

VIANA, João Henrique Moreira. Estatística do mercado de embriões: Estatísticas da produção e transferência de embriões no período pré-pandemia: Qual o real tamanho do mercado brasileiro?, **o embrião**, Jaboticabal, 26 p, set., 2021.

WHITTEN, W. K. Culture of tubal mouse ova. **Nature**, Canberra, v.177, 96 p., jan., 1956.

CAPITULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio é um importante complemento para a vida acadêmica por levar o estudante para a rotina da profissão, colocar em prática os aprendizados teóricos e adaptá-los à realidade, também é o momento de errar enquanto possui supervisão e aprender com esses erros. O mercado de trabalho busca cada dia mais profissionais competentes, e isso não se limita apenas a conhecimentos teóricos e sim um conjunto de qualidades que formam um bom profissional, como ter um bom relacionamento interpessoal e marketing pessoal, ética, empatia, profissionalismo, maturidade emocional e proatividade, alcançar essas habilidades não são apenas fatores intrínsecos, mas também que podem ser desenvolvidos e é no estágio o momento para iniciar isso.

A criação de uma *network* tem seu início na vida acadêmica e se estende ao longo da vida profissional, iniciando com os docentes e depois com futuros clientes ou colegas de serviço, a intermediação desse momento ocorre no estágio, dessa forma é possível afirmar que quando essa etapa da vida acadêmica é feita de forma adequada o acadêmico possui mais vantagem ao entrar no mercado de trabalho.

O estágio curricular do presente trabalho de conclusão de curso foi de grande acréscimo profissional e pessoal, sendo obtidos muitos ensinamentos dos diferentes profissionais da empresa, a realização de treinamentos para adição de conhecimentos técnicos e teóricos, principalmente voltado para a área de produção de embrião *in vitro* na área do laboratório, mas sem deixar de conhecer toda a cadeia produtiva.

Assim, todos os objetivos para o estágio, que se remetia ao aprendizado de embriões *n vitro*, foram cumpridos de forma íntegra e ainda foram realizadas técnicas e aprendido ensinamentos além do proposto, que agregaram tanto de forma curricular quanto de forma pessoal.