

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

V696p Vilanova, Camila.
PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS. / Camila
Vilanova. – Araguaína, TO, 2017.
29 f.

Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins –
Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Zootecnia, 2017.
Orientador: Marcio Gianordoli Teixeira Gomes

1. Fertilidade. 2. Genética. 3. Reprodução. 4. Produção. I. Título

CDD 636

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA
CURSO DE ZOOTECNIA

CAMILA SOUSA VILANOVA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

ARAGUAÍNA
2017

CAMILA SOUSA VILANOVA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Zootecnia

Orientador: Prof. Dr. Márcio Gianordoli
Teixeira Gomes

Supervisora: Nayara Gonçalves de Oliveira

ARAGUAÍNA -TO
2017

Dedico este trabalho em especial aos meus pais (Maria Iranide de Alencar Sousa e Fernando Vilanova Novaes Oliveira), e minha irmã (Caroline Sousa Vilanova), que amo incondicionalmente. Dedico também aos meus professores que sempre me incentivaram a ir mais longe, me apoiando e sonhando junto comigo para a realização de tornar-me Zootecnista.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, pois sem Ele nada seria possível, caminho nenhum seria percorrido e sonho algum seria alcançado, Ele que esteve sempre comigo, presente nos melhores momentos e incomparavelmente nos mais difíceis. Obrigada Senhor por tudo, pois me destes mais do que um dia imaginei.

De todo meu coração e, amor incondicional, agradeço aos meus pais Fernando Vilanova Novaes Oliveira, Maria Iranide de Alencar Sousa e a minha irmã Caroline Sousa Vilanova.

Agradecer ao meu orientador, Professor Dr. Márcio Gianordoli Teixeira Gomes, que me orientou durante todo o período de estágio curricular obrigatório e também na sala de aula com disciplinas importantíssimas desde o primeiro período da graduação, até este tão esperado período sendo ele o último, o meu muito obrigada.

À In Vitro Brasil por proporcionar esta oportunidade de estágio, em especial à Nayara Gonçalves Oliveira, e quero agradecer também as meninas do laboratório, ao pessoal do treinamento e a todos da empresa que ensinaram um pouco do que sabem dia a dia para somar ao meu aprendizado, fica aqui minha gratidão.

Agradeço a Universidade Federal do Tocantins, aos professores, que cada um com a sua forma de ensinar me ajudou a chegar até aqui, a conquistar cada degrau passo a passo, a entender que para vencer é necessário lutar, lembrarei sempre de todos com carinho e gratidão.

E por fim, para todos que estiveram comigo durante essa fase da minha vida, nessa longa trajetória, meu obrigada de coração.

RESUMO

Todos esses processos são acompanhados desde a Maturação após os oócitos serem aspirados de vacas doadoras nas propriedades rurais de clientes da empresa e trazidos ao laboratório, até o momento de envase dos mesmos para a transferência de embriões em vacas receptoras. As atividades desenvolvidas na empresa *In Vitro* Brasil S/A tiveram como objetivo principal práticas de laboratório na produção in vitro de embriões bovinos. No laboratório são realizados procedimentos tais como: Maturação de oócitos bovinos em meio de maturação, Fertilização in vitro dos oócitos maturados, Cultivo dos embriões em meio específico, Clivagem, Previsão e Envase para a Transferência dos embriões. As atividades realizadas tornaram melhor o entendimento sobre a Produção In Vitro de Embriões (PIVE), contribuindo para a formação profissional.

Palavras-chaves: fertilidade, genética, reprodução.

ABSTRAT

All these processes are followed from the Maturation after the oocytes are aspirated from donor cows in the rural properties of clients of the company and brought to the laboratory, until the moment of packaging of the same ones for the transfer of embryos in receiving cows. The activities developed in the company In Vitro Brazil S / A had as main objective laboratory practices in the in vitro production of bovine embryos. In the laboratory are performed procedures such as: Maturation of bovine oocytes in maturation medium, In vitro fertilization of mature oocytes, Culture of embryos in specific medium, Cleavage, Prediction and Packaging for the transfer of embryos. The activities carried out improved the understanding of In Vitro Production of Embryos (PIVE), contributing to professional training.

Key-words: fertility, genetics, reproduction.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. DADOS DO ESTÁGIO	10
2.1 Local e período de estágio.....	10
2.2 Descrição da empresa	10
3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	11
3.1 Preparo de tubos para a maturação <i>in vitro</i> (MIV) de oócitos.....	11
3.1.1 <i>Ovum-pickup</i> OPU	12
3.1.2 Aspiração folicular de ovários oriundos de abatedouro e envase de oócitos em tubos de maturação.....	13
3.1.3 Recuperação, seleção e envase de oócitos em tubos de maturação a campo	16
3.2 Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	17
3.3 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	17
3.3.1 Preparo de placas e de meios para a FIV	18
3.3.2 Lavagem e preparo dos oócitos	18
3.3.3 Preparo do sêmen	19
3.3.4 Fertilização <i>in vitro</i> do embriões (FIV).....	20
3.4 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	20
3.5 Previsão dos embriões produzidos	21
3.6 Classificação dos embriões e envase	21
3.6.1 Vitrificação	23
3.6.2 Desvitrificação.....	25
3.7 Transferência de Embriões	26
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Laboratório <i>In Vitro</i> Brasil, Xinguara-PA.....	11
Figura 2- Equipamentos utilizados a campo.....	13
Figura 3- Ovário bovinos oriundos de abatedouro em banho maria.....	14
Figura 4- Oócitos bovinos viáveis para a PIVE.....	16
Figura 5- Identificação de placas com o meio para a FIV no laboratório <i>In Vitro</i> em Xinguara - PA.....	18
Figura 6- Equipamentos utilizados para lavagem dos oócitos	19
Figura 7- Eppendorfs identificados contendo sêmens de diferentes touros para a realização da fertilização <i>in vitro</i>	20
Figura 8- Envase dos embriões para transferência a freco.....	22
Figura 9- Embriões envasados e colocados em transportadora	23
Figura 10- Processo de vitrificação de embriões bovinos	24
Figura 11- Técnica de laboratório vitrificando de embriões.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos do mês de Agosto à Outubro de 2017.....	11
---	----

1. INTRODUÇÃO

À intensa seleção de características produtivas através do aperfeiçoamento de biotecnias de manejo reprodutivo nos últimos anos tem aumentado significativamente a produtividade dos rebanhos bovinos. Com isso, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) vêm sendo desenvolvida a fim de se maximizar o potencial reprodutivo de fêmeas bovinas e melhorar os indicadores de produtividade (BURATINI JR, 2006). Viabilizando a utilização de animais mais jovens, diminuindo o intervalo de gerações e permitindo selecionar matrizes de maior potencial, otimizando o melhoramento genético (VARAGO et al., 2008).

A PIVE foi expandida em diferentes espécies animais pouco tempo depois do nascimento de Louise Brown em 1978, na Inglaterra, sendo o primeiro bebê de proveta do mundo (STEPTOE e EDWARDS, 1978). No ano de 1982, o primeiro bezerro bovino nasceu produzido através da fecundação *in vitro* nos Estados Unidos (BRACKETT et al., 1982), e que só foi possível através das pesquisas desenvolvidas inicialmente com animais de laboratório.

Segundo HAFEZ e HAFEZ (2000), a fêmea bovina possui, em idade da puberdade, aproximadamente 70.000 oócitos em seus ovários, que por meios naturais, podem gerar por volta de 0,01% de produtos viáveis, sendo um número próximo de dez descendentes em toda sua vida reprodutiva (BOLS et al., 1997).

O Brasil começou a utilizar a técnica comercialmente nos anos 2000. Hoje, o país se tornou o maior produtor mundial de embriões bovinos e a referência no uso da Produção *In Vitro* em bovinos, que se destaca na exportação de genética nacional (MAPA, 2017).

Atualmente, com mais de 50% do Market Share Global, a *In Vitro* Brasil segue em busca de projetos globais de embriões FIV em larga escala, consolidando-se cada vez mais como a maior empresa de produção *in vitro* de embriões bovinos do mundo, produzindo 70% dos embriões comercializados no mundo.

2. DADOS DO ESTÁGIO

2.1 Local e período de estágio

O estágio foi realizado no período de 02 de Agosto à 30 de Outubro do ano de 2017 na Empresa In Vitro Brasil S/A - filial Pará, com duração de 30 horas semanais, com um total de 360 horas de estágio curricular sobre supervisão da Biomédica Nayara Gonçalves de Oliveira e orientação do Prof. Márcio Gianordoli Teixeira Gomes.

2.2 Descrição da empresa

Fundada em 2002, a empresa de Biotecnologia da Reprodução Animal In Vitro Brasil (IVB) surgiu para atender o mercado crescente de produção *in vitro* de embriões bovinos. Entre os principais avanços conquistados pela empresa, podemos destacar a viabilização do uso de sêmen sexado na FIV, a tecnologia de transporte de embriões para longas distâncias e o desenvolvimento da técnica de vitrificação eficiente de embriões FIV, este um grande diferencial tecnológico do Grupo IVB até os dias atuais.

A In Vitro Brasil iniciou a implantação de um sistema de afiliação, tanto em nível nacional como internacional, atualmente, o Grupo IVB conta com 37 laboratórios, entre próprios e afiliados, distribuídos em 17 países (Brasil, Colômbia, Estados Unidos, México, Moçambique, África do Sul, Argentina, Austrália, Bolívia, Panamá, Paraguai, Quênia, República Dominicana, Uruguai, Venezuela e Rússia).

Em 2015, realizou a venda de 51% de suas ações para o grupo Genus PLC, nesse ano de 2017, foi anunciada a venda de 100% de suas ações. A In Vitro Brasil segue em busca de projetos globais de embriões FIV em larga escala, consolidando-se cada vez mais como a maior empresa de produção *in vitro* de embriões bovinos do mundo.

A empresa conta com um dos seus laboratórios na Av. Xingú na cidade de Xinguara- PA. Telefone (94) 3426-4186. Na qual é composta pelo laboratório e um centro de treinamento para a área de campo (Figura 1).



Figura 1 – Laboratório *In Vitro* Brasil, Xinguara-PA

3.ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Em todo o período de estágio foram acompanhadas as atividades de laboratório referente a Produção *In Vitro* de Embriões bovinos. Atividades a campo foram acompanhadas sendo elas envase e transferência de embriões.

Tabela 1. Produção *in vitro* de embriões bovinos do mês de Agosto à Outubro de 2017.

Meses	Nº de asp	(MIV)	CLIV	Estruturas aspiradas totais	Emb viáveis	Total de TE's	Pren S/D	Pren	Cong	Vend / Desc
Agosto	186	4669	3744	4798	1602	1010	198	338	325	263
Setembro	232	5834	4776	6290	2091	1062	533	208	654	371
Outubro	357	9800	8035	10742	2815	1957	580	578	489	363
Total	775	20303	16555	21830	6508	4029	1311	1124	1468	997

Legenda: **Nº de asp:** Número de aspirações; **MIV:** Maturação *In Vitro*; **CLIV:** Clivagem *In Vitro*; **Emb viáveis:** Embriões viáveis; **Total de TE's:** Transferências de Embriões; **Pren S/D:** Prenhes Sem Diagnóstico; **Pren:** Prenhes; **Cong:** Congelados; **Vend/ Desc:** Vendidos ou Descongelados.

3.1 Preparo de tubos para a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos

Para a MIV devem ser preparados uma determinada quantidade de meio MIV e meio de lavagem em criotubos de acordo com a quantidade estimada de doadoras a serem aspiradas e em seguida calculada a quantidade dos meios necessários para a seleção e maturação dos oócitos aspirados, nesse processo também utilizou-se óleo mineral no criotubos. As fontes proteicas de origem animal que suplementam o meio

tem apresentado resultados melhores na maturação dos oócitos e no desenvolvimento embrionário (CAROLAN et al., 1995).

Repassaram-se o meio nos criotubos em gás de mistura padrão (5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂) por aproximadamente 20 segundos, o gás tem função de manter as condições do meio MIV, principalmente o pH, depois refrigerados a 12°C e os mesmos foram preparados até quatro dias antes da aspiração. Utilizaram-se um criotubo para cada vaca, em cada criotubo poderia conter 50 oócitos depois de serem aspirados e selecionados, sendo cada criotubos de 5ml.

A preparação dos meios em criotubos foi feita na capela de fluxo laminar horizontal, nesses criotubos adicionou-se 400 µl de meio MIV e 300 µl de óleo mineral, em seguida os criotubos foram gaseificados, após esse processo vedou-se os criotubos com rolhas de silicone e por fim refrigerados até o momento da OPU. A equipe de campo transportou os criotubos para a fazenda em caixas de isopor com gelo a fim de manter a temperatura adequada.

O preparo do meio lavagem foi feito em tubos de 15 ml em uma quantidade de 400 µl de meio para cada vaca aspirada, utilizou-se este meio para lavagem e seleção dos oócitos aspirados tanto em campo quanto oócitos de ovários oriundos de abatedouro, o meio foi gaseificado da mesma forma do meio MIV, mas com o tempo de dez à vinte segundos quando se trata do meio lavagem e depois refrigerando, se for para a aspiração em campo e aquecido em campo, quando para aspiração de ovários de abatedouro o aqueceu-se o meio na incubadora podendo ficar incubado por até quatro horas antes do uso sendo o tempo mínimo de uma hora, o mesmo serve para o meio de Maturação (MIV).

3.1.1 *Ovum-pickup* OPU

A aspiração folicular guiada por ultrassom iniciou-se com a assepsia e tricotomia da região sacral do animal, seguida de anestesia epidural baixa, 1 à 5 ml de Lidocaína a 2% no espaço sacrococcígeo. Posteriormente realizou-se o esvaziamento do reto e limpeza da vulva com água e secagem com papel toalha.

A técnica consistia em introduzir uma probe microconvexa até o fórnix vaginal. Essa probe está contida no interior de uma guia e acoplada a um sistema de aspiração a vácuo, o qual possui em sua extremidade um cateter. Posicionou-se o ovário diante

da probe por meio de manipulação transretal, permitindo a visualização dos folículos. O induziu-se o cateter nos folículos através da manipulação do mandril que estava acoplado a um sistema de vácuo a uma pressão de até 75 mmHg. É muito importante para o sucesso da aspiração a regulagem dessa pressão, devido ao risco de desnudar os oócitos. Transportando as células por um sistema rígido e chegando a um tubo *corning* de 50 ml contendo 5 ml de DPBS (tampão fosfato salino) com 400 µl de heparina.

Ao finalizar a aspiração, identificou-se os tubos que foram levados para o laboratório montado na própria fazenda (Figura 2). No laboratório foi realizada a seleção e envase dos oócitos recuperados em criotubos de maturação. Devido à fotossensibilidade das estruturas, é importante a proteção dos criotubos contra a luminosidade durante o transporte dos oócitos entre o curral e o técnico selecionador.



Figura 2 – Equipamentos utilizados a campo. A- Pano de campo para forrar o local dos equipamentos que foram utilizados, recipiente de banho maria, microtubo, DPBS (tampão fosfato salino), estereomicroscópio e luvas de procedimento. B- Aparelho de ultrassom utilizado no processo de aspiração folicular.

3.1.2 Aspiração folicular de ovários oriundos de abatedouro e envase de oócitos em tubos de maturação

A aspiração *in vitro* de oócitos vindos de abatedouro realizou-se com punção folicular com agulha e seringa de 10 ml, o transporte dos ovários foi realizado em garrafas térmicas de café. De acordo com GONÇALVES et al. (2002), o tempo de até três horas entre a obtenção dos ovários e início de colheita de oócitos parece não

prejudicar a viabilidade dos oócitos. Os ovários chegavam ao laboratório por volta das oito horas da manhã, eram retirados das garrafas e lavados em um escorredor com soro fisiológico aquecido a 37°C e depositados em um Becker de um litro, e mantidos a temperatura de 37°C em banho-maria, afim de conservar a qualidade dos oócitos aspirados (Figura 3). Ovários obtidos de abatedouros geralmente são transportados para o laboratório em caixas de isopor ou garrafas térmicas com solução salina a 0,9% de NaCl aquecido entre 30 – 35 °C (GONÇALVES et al., 2002).



Figura 3 - Ovários bovinos oriundos de abatedouro em banho maria.

Após aspirados, iniciou-se o processo de lavagem com soro fisiológico e utilização do filtro coletor de oócitos (150 ml de capacidade e tela de *nylon* com orifício de 75 micra), para que ficassem os oócitos e o mínimo de impurezas da aspiração, e depois desse processo depositou-se em uma placa de Petri de 90 mm, lavou-se o filtro novamente com soro fisiológico utilizando a leve pressão da seringa de 20 ml também com soro fisiológico, para remover os oócitos retidos no filtro.

Selecionou-se os oócitos com o auxílio de uma lupa e pipeta de 10 µl, e em outra placa de Petri 90 mm, podendo ser a tampa desta mesma placa, preparou-se três gotas de 100 µl cada, com o meio de lavagem em que eram lavados de gota a gota, e na terceira gota classificados de acordo com as células do *cumulus* e o citoplasma.

Realizou-se a classificação em oócitos de Grau I, II, III, oócitos desnudos, de citoplasma irregular, degenerados e atrésicos.

Grau I: eram oócitos viáveis e com melhor qualidade, eles possuíam mais de três camadas de células da granulosa, *cumulus* compacto e citoplasma com granulações homogêneas. Grau II: eram semelhantes aos de grau I, mas com quantidade um pouco inferior de células da granulosa (entre 1 a 3 camadas), *cumulus* compacto e seu citoplasma preenche toda a zona pelúcida. Grau III: os mesmo apresentam poucas camadas de células da granulosa, porém ainda são considerados como oócitos viáveis. Os oócitos desnudos apresentavam o núcleo completo, o que os diferenciou dos anteriores foi a ausência de células da granulosa ou apresentavam em quantidades bem menores, eles não foram classificados como oócitos viáveis, mas possuíam pouca capacidade de desenvolvimento como embrião. Os oócitos de citoplasma irregular, independente da quantidade de células da granulosa, possuíam menor qualidade, porque apresentavam citoplasma heterogêneo, de regiões escuras e claras, indicando ooplasma contraído com espaço entre a zona pelúcida e membrana celular, degeneração, fragmentação ou vacuolização citoplasmática. Oócitos degenerados apresentavam tonalidade muito clara, independente da quantidade das células da granulosa, são oócitos inviáveis para a PIVE. E por fim oócitos atrésicos eram aqueles que apresentavam células do *cumulus* expandida e com citoplasma que pode se apresentar normal ou anormal, e estes são semelhantes à oócitos presentes em folículos pré-ovulatórios, em que passam por processo de maturação e também não eram viáveis para a produção.

Segundo GONÇALVES et al. (2002), pode-se realizar a classificação dos oócitos como a escala de um a quatro, qualidade um: *Cumulus* compacto, presente, contendo mais de três camadas de células, ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom. Qualidade dois: *Cumulus* compacto, parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares, ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche o espaço do interior da zona pelúcida. Qualidade três: *Cumulus* presente, mas expandido, ooplasma contraído com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço

perivitelínico, degenerando, vacuolizando ou fragmentando. Qualidade quatro: oócito desnudo (sem *cumulus*).

Na produção comercial dos embriões se utilizava oócitos de graus I, II e III, com citoplasma irregular e desnudo, já oócitos atrésicos e degenerados foram descartados e não foram enviados para o laboratório (Figura 4).

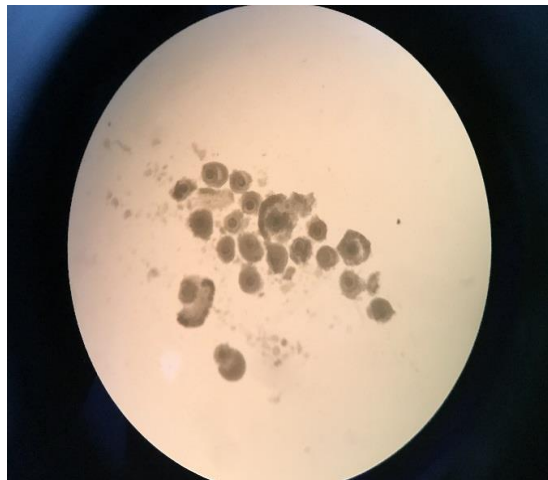


Figura 4 – Oócitos bovinos viáveis para a PIVE.

Os oócitos foram envasados em criotubos de maturação, com uma pipeta de 10 μ l eram recolhidos até trinta oócitos selecionados como viáveis e depositados no meio MIV aquecido, o tubo passava por gás de mistura padrão (5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂), e vedados com rolha de silicone, colocados na incubadora (38,5 °C, 5% de CO₂ e umidade saturada), o técnico de laboratório enumerava doadoras mesmo as mesmas sendo oriundas de abatedouro para controle dos resultados da produção, anotava-se em uma ficha a identificação de campo, quantidade de oócitos e horário de todos os procedimentos. A partir daí iniciava-se a maturação, que apresentava duração entre vinte e duas a vinte e seis horas.

3.1.3 Recuperação, seleção e envase de oócitos em tubos de maturação a campo

Quando os oócitos chegavam do campo, após o processo de armazenamento dos mesmos no meio MIV que a partir daí já se iniciou a contagem do processo de maturação, transportando-os até o laboratório através de uma transportadora e a da maturação que tinha duração de vinte e duas à vinte e seis horas, e as anotações de

campo auxiliavam o restante da contagem no laboratório de PIVE até o final da maturação para que ocorresse a Fertilização.

3.2 Maturação *in vitro* (MIV)

A maturação *in vitro* é influenciada por diferentes fatores, tais como meio de cultivo, atmosfera gasosa, temperatura, suplementação proteica e fatores de crescimento (SANTOS et al., 2002; SUTTON-MCDOWALL et al., 2012). Os criotubos eram transportados para o laboratório, retirados das transportadoras e colocados em raques de dentro do fluxo laminar. Substituíam-se as rolhas de silicone por tampas de plástico, para que o criotubo não ficasse hermeticamente vedado para permitir a entrada de gás nos criotubos que iam para a incubadora, esse processo já foi realizado com oócitos selecionados de ovários de abatedouros assim como mencionado anteriormente.

Em seguida colocou-se os criotubos em incubadora (38,5 °C, 5% de CO₂ e umidade saturada), onde permaneceram por um período de vinte e duas à vinte e seis horas (contadas a partir do momento que foram envasados no meio MIV). Todas as informações possíveis deveriam ser anotadas, as de campo eram muito importantes para a realização dos processos realizados no laboratório, e por isso o técnico responsável de campo anotava todas as informações e observações, como horário de chegada, temperatura da transportadora e qualquer alteração na qualidade dos meios e dos criotubos, e se houvesse qualquer imprevisto no transporte.

Esse processo antecedia a fertilização *in vitro* (FIV), contada como D-1 da PIVE.

3.3 Fertilização *in vitro* (FIV)

O processo de Fertilização FIV consistia em várias etapas até a fertilização dos oócitos maturados. A fecundação do oócito está ligada a uma bioquímica complexa, que inicia no aumento da motilidade do espermatozoide, que sofre capacitação, depois reconhecimento de receptores na zona pelúcida do oócito, em seguida reação acrossômica, liga-se na membrana plasmática do oócito e por fim se incorpora ao citoplasma (DODE & RODOVALHO, 2002).

O preparo de placas e dos meios, preparo do sêmen e dos oócitos maturados. Ao iniciar qualquer uma das etapas de PIVE conferia-se todos os dados, tais como: identificação das vacas aspiradas e acasalamento, e assim estabelecia-se o horário de início da FIV, ressaltando a importância do tempo nos procedimentos que eram importantes para a qualidade da produção, quanto menor o tempo melhor a qualidade.

3.3.1 Preparo de placas e de meios para a FIV

Utilizou-se na FIV os meios TL, Percoll e meio FIV, estes foram preparados e colocados na incubadora (38,5 °C, 5% de CO₂ e umidade saturada), para equilíbrio de pH e temperatura no tempo mínimo de uma hora.

Em seguida separou-se as placas de Petri 35 mm para a fertilização, identificando-as de início com o nome do cliente, número das doadoras, nome do touro utilizado no acasalamento e data da FIV. Em cada placa poderia ter no máximo cinco gotas do meio FIV e cada gota no máximo trinta oócitos para serem fertilizados (Figura 5).



Figura 5 – Identificação de placas com meios para a FIV no Laboratório *In Vitro* em Xinguara-PA. A- Identificação de placas com o meio para a FIV, o nome do touro, nome do proprietário, data da FIV, numeração das gotas, estando aquecidas a uma placa térmica. B- Uso de canetas coloridas facilitando a identificação das placas.

3.3.2 Lavagem e preparo dos oócitos

Após a maturação os criotubos com oócitos foram retirados da incubadora e colocados no fluxo laminar para iniciar o processo de lavagem dos mesmos, preparou-

se duas gotas em uma placa de Petri 90 mm, e ela tem a função de capacitação espermática devido a presença dos glicosaminoglicanos, composto presente no fluido tubárico da fêmea que permite a capacitação dos espermatozoides (Figura 6).

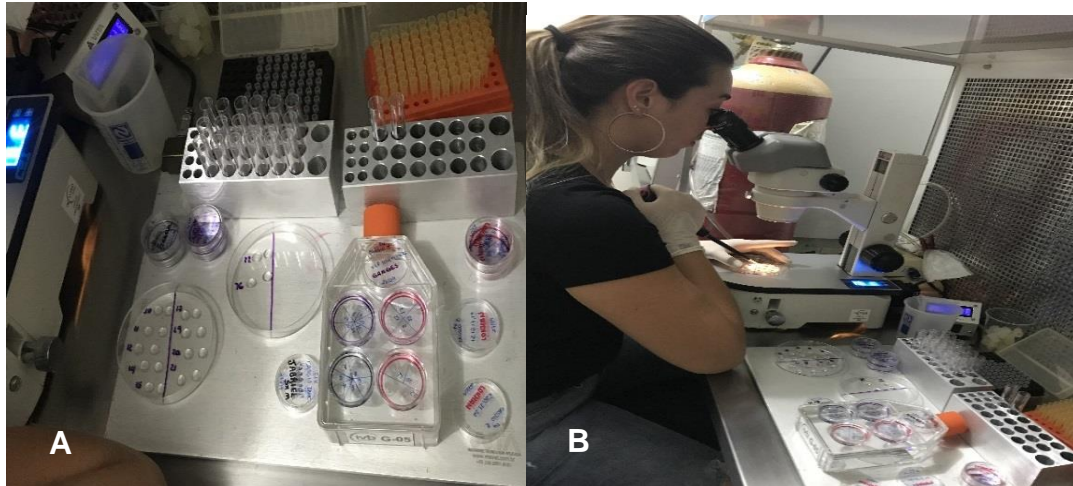


Figura 6 – Equipamentos utilizados para lavagem dos oócitos. A- Placa de Petri utilizada para lavagem dos oócitos e em seguida repassados para uma placa de 35mm, e aquecidos a uma placa térmica durante este processo. B- Técnica de laboratório realizando a lavagem dos oócitos bovinos em placa sob estereomicroscópio.

Para serem preparados os oócitos foram retirados com uma pipeta de 10 μ l dos criotubos e lavados na primeira gota, na segunda gota finalizando o processo de lavagem que contém meio FIV. Depois da lavagem pipetaram e colocaram os oócitos de acordo com as descrições nas gotas de FIV das placas de Petri 35 mm e levaramos para a incubadora até o momento que os espermatozoides estivessem prontos para a fertilização.

3.3.3 Preparo do sêmen

Utilizaram-se diferentes protocolos de seleção espermática, em relação com a raça e com histórico de produção do sêmen dos touros e sêmen sexado e convencional. Antes de iniciar o cultivo de oócitos e espermatozoides em meio de fertilização, o sêmen de touro é preparado através de técnicas que possibilitam a separação de espermatozoides vivos dos demais componentes do sêmen e seus crioprotetores (GONÇALVES et al., 2002). Para permitir boas taxas de fecundação, o preparo do sêmen deveria obter espermatozoides capacitados e livres de diluentes,

usava-se sêmen congelado nos procedimentos. Os eppendorfs deveriam ser preparados junto com o meio FIV e mantidos na incubadora fechados por uma hora, somente o de lavagem e TL deveriam ser mantidos semi aberto na incubadora.

3.3.4 Fertilização *in vitro* do embriões (FIV)

Os oócitos foram lavados e preparados para a FIV, a fecundação das gotas foi diferente para sêmen sexado e sêmen convencional. Quando fecundada a gota com oócitos através da lupa se observava na parte superior da gota a concentração e motilidade espermática para avaliar o sêmen entre 50% à 90% (Figura 7).

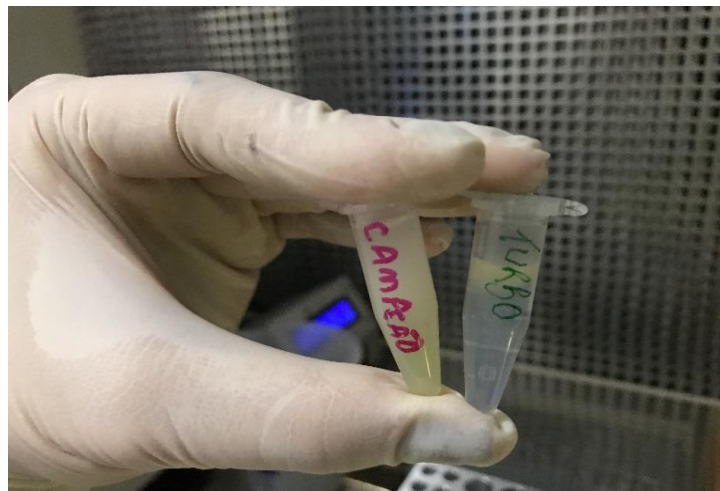


Figura 7 – Eppendorfs identificados contendo sêmen de diferentes touros para a realização da fertilização *in vitro*.

Abaixo de 60% da motilidade da avaliação espermática o ideal é o acréscimo de mais sêmen na gota, e em casos extremos trocar o sêmen, touro ou partida. Após a FIV as incubaram-se as placas à 38,5 °C, 5% de CO₂ e umidade saturada por vinte e quatro horas, o processo de fecundação é o Dia zero (D 0) da PIVE.

3.4 Cultivo *in vitro* (CIV)

Após a fecundação as células do *cumulus* não tinham mais função, retirou-se o máximo de sujeira possível, oócitos mortos, os de citoplasma muito claro, fragmentado, rompido ou muito escuro, e na terceira gota de meio foi realizada a contagem dos oócitos que foram para o cultivo e com uma pipeta, repassaram-se as estruturas para as gotas nas placas de CIV, e colocadas no máximo trinta estruturas

por gota. Em seguida, realizava-se o cultivo em incubadora à 38,5 °C, 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂ e umidade saturada, e anotadas as quantidades de oócitos para o cultivo por vaca nas fichas.

3.5 Previsão dos embriões produzidos

No sexto dia (D6), um dia antes da transferência de embriões fazia-se a contagem dos mesmos para a estimativa de aproveitamento e preparo das receptoras. As informações durante a previsão também tinham total importância para as programações da equipe do laboratório referente às atividades relacionadas à saída dos embriões: envase, criopreservação e quando necessário desvitrificação dos embriões congelados contidos no estoque dos cliente, se a produção à fresco não atingir o número protocolado de receptoras.

3.6 Classificação dos embriões e envase

Classificados e envasados no último dia (D7), os embriões foram transferidos ou vitrificados para criopreservação. Para classifica-los foi necessário observar o estágio de desenvolvimento e a qualidade dos embriões. Sobre o estágio de desenvolvimento, a classificação utilizada foi proposta pela *International Embryo Transfer Society* (IETS), sendo:

- 1.Mórula (Mo): os blastômeros estão agregados entre si, formando uma massa compacta;
- 2.Blastocisto inicial (Bi): início da formação da blastocèle, início da diferenciação entre trofoblasto e massa celular interna;
- 3.Blastocisto (Bl): no blastocisto existe uma evidente diferenciação entre células do trofoblasto e do botão embrionário, as células da massa celular interna estão compactas, a blastocèle é predominante;
- 4.Blastocisto expandido (Bx): o embrião aumenta distendendo a zona pelúcida, a qual diminui em 1/3 em sua espessura. É bem evidente a pressão do líquido da blastocèle pressionando então o trofoblasto contra a membrana pelúcida;
- 5.Blastocisto em eclosão (Bn): quando o embrião está iniciando o processo de saída da zona pelúcida;

6. Blastocisto eclodido (Be): o embrião está completamente livre da zona pelúcida, a presença da blastocele é nítida ainda.

Junto com a classificação do desenvolvimento dos embriões também devia classificar a qualidade de acordo com tais parâmetros: embriões de formato esférico da zona pelúcida, assim como a massa celular, a coloração devia ser homogênea sendo a blastocele sempre mais clara que a massa central da célula.

Após a avaliação dos embriões selecionaram-se os melhores para procedimentos à fresco, e para a criopreservação vitrificaram os embriões que estavam em grau de desenvolvimento, sendo eles Bn, Bx e BI.

Para a realização do envase o meio de envase foi colocado em placa TPP, com o auxílio de uma pipeta de 10 μ l os embriões foram retirados das gotas de cultivo e repassados para a placa com meio de envase, e em seguida classificados pela qualidade e estágio de desenvolvimento para serem envasados. As palhetas de envase eram acopladas à uma seringa de 1 ml, envasados os embriões um a um sempre contando-os para não haver duplicidade ou palhetas vazias. Eram aspiradas duas colunas do meio de envase intercaladas por ar, o embrião aspirado junto à uma quantidade maior de meio de envase e novamente aspiradas duas colunas de meio de envase intercalado com ar, e na extremidade da palheta encaixava-se um lacrador identificado numericamente com a ordem dos embriões (Figura 8).

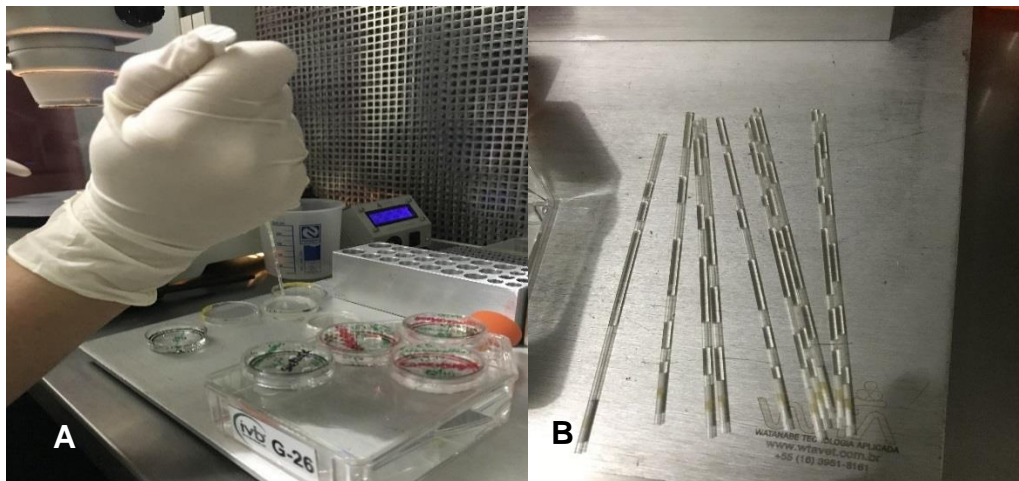


Figura 8 – Envase dos embriões para transferência a fresco. A- Técnica de laboratório envasando os embriões junto ao meio de envase na palheta. B- Palhetas envasadas com embriões e prontas para o processo de transferência de embriões.

Os embriões envasados foram colocados na transportadora aquecida à 36,5 °C e na ordem anotavam-se os mesmos e classificavam na planilha de controle, e depois transportados ao local da TE (Figura 9). O meio de envase foi utilizado devido ter uma substância chamada HEPES que tem função de tampão, permitindo que não aconteça nenhuma perda no transporte, pois age para não haver alterações de pH no meio.

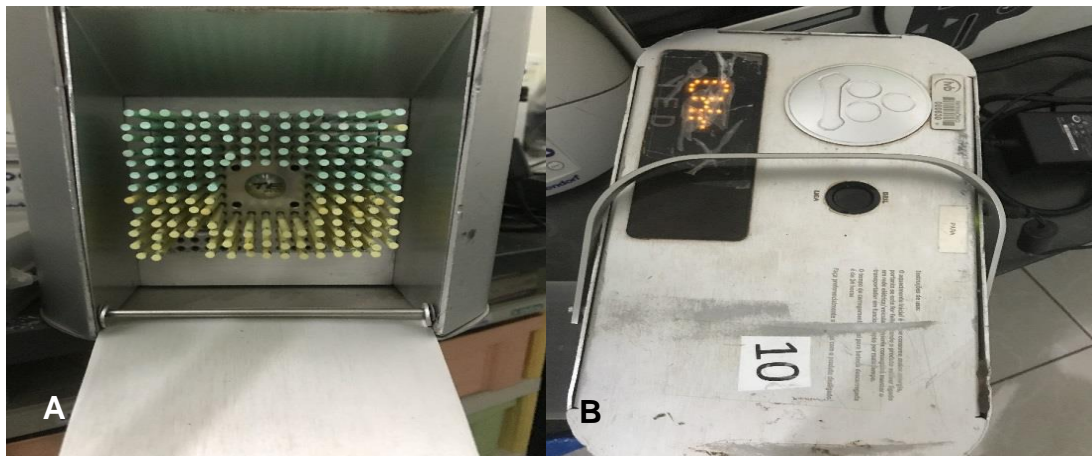


Figura 9 – Embriões envasados e colocados em transportadora. A- Transportadora com embriões já envasados e identificados. B- Transportadora de embriões pronta para ir para o campo para a realização da técnica de TE.

3.6.1 Vitriificação

Para criopreservar dos embriões foi realizada a vitriificação, em que se congelavam os embriões ultra rápido mediante imersão no nitrogênio líquido. utilizados *Open Straw Pulled OPS*, que eram palhetas esticadas contendo um corte em bisel.

A OPS foi identificada com pontos de determinadas cores que diferem com a quantidade de embriões a foram vitrificados, os meios foram preparados em placas que contém quatro poços enumerados de um a quatro da esquerda para a direita.

Os meios usados eram compostos por crioprotetores permeáveis, que penetravam na célula devido ao baixo peso molar, alterando a osmolaridade do embrião. Os crioprotetores impermeáveis são responsáveis por alterar a osmolaridade do meio extracelular onde o embrião está imerso e assim promover a desidratação, com a finalidade de diminuir ou não formar cristais de gelo durante o processo de criopreservação (Figura 10).

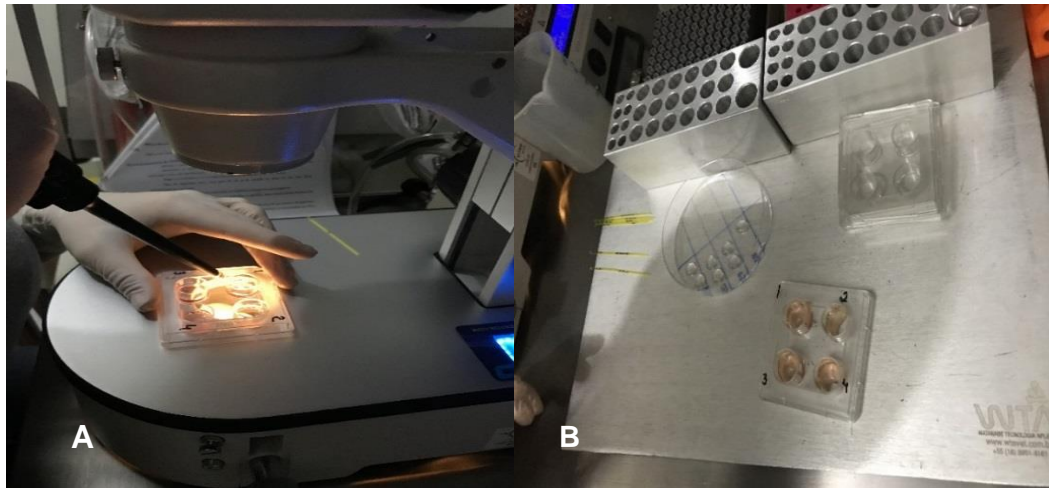


Figura 10 – Processo de vitrificação dos embriões bovinos. A- Técnica de laboratório utilizando pipeta com auxílio do estereomicroscópio para vitrificar os embriões em meio específico. B- Placa de vitrificação com meio específico enumerada de 1 à 4, e placa de Petri utilizada durante o procedimento.

Selecionados os embriões que seriam vitrificados e em seguida colocados nos poços três e quatro da placa de vitrificação contendo meio específico, seguindo a ordem das vacas de preferência no sentido horário. Em uma OPS poderiam ser vitrificados de um à cinco embriões, inicialmente colocava-se os embriões no poço um e se iniciava a contagem do tempo, aos trinta segundos preparava-se uma gota de 10 μ l da solução do poço dois em uma placa quadriculada separada, aos cinquenta segundos se observava através da lupa a posição dos embriões e prepara-se para passá-los para a gota na placa quadriculada no tempo de um minuto, levando o mínimo de meio possível junto aos embriões, que deviam permanecer nesta gota da placa de solução do meio dois por vinte segundos e durante esses mesmos vinte segundos foram adicionados os embriões no bisel da OPS e mergulhados diretamente no nitrogênio líquido (Figura 11).



Figura 11- Técnica de laboratório vitrificando embriões.

Depois de vitrificados todos os embriões nas OPS, elas foram armazenadas em uma raque identificada com o nome do proprietário e data da vitrificação e em seguida armazenadas em um botijão de nitrogênio por período indeterminado, onde serão desvitrificados de acordo com as necessidades do cliente, além disso as características e classificações dos embriões e OPS foram feitas em uma planilha adequada para armazenamento de todos dados possíveis para melhor controle de produção.

3.6.2 Desvitrificação

A desvitrificação é uma técnica em que o embrião é reaquecido e reidratado para voltarem ao seu desenvolvimento fisiológico. No início do processo preparou-se uma placa de quatro poços enumerados de um à quatro.

No próximo passo pega-se a OPS contendo os embriões e mergulha-a no poço um, depois repassar os embriões para o poço dois que permanecerão por tempo de cinco minutos e na sequência repassados para o poço três, que foram mantidos novamente por cinco minutos, os embriões foram repassados para o poço quatro após o tempo do poço três, depois lavados e envasados no meio de envase, envasados da mesma forma que embriões a fresco e preparados para serem levados ao campo para a técnica de TE.

3.7 Transferência de Embriões

A TE é a técnica em que se deposita o embrião produzido *in vitro* no terço médio final do corno uterino da receptora bovina protocolada pelo método transcervical no sétimo dia (D7) da produção *in vitro*.

Após a seleção e envase dos embriões nas palhetas identificadas com os lacradores e transportadas para o campo junto ao médico veterinário para o local da transferência. A bainha de transferência recebeu a palheta contendo o embrião acoplada ao inovulador é então colocado usando camisinha sanitária para evitar contaminações vindas da bainha através das receptoras. Antes de iniciar o procedimento realizou-se anestesia epidural com 4 ml de Lidocaína 3%, em seguida ocorreu a passagem da bainha pela cérvix da receptora, a camisinha foi rompida e logo em seguida o embrião foi depositado no corno uterino, após a técnica anotou-se os dados da receptora por uma pessoa atenta em uma planilha de controle junto aos dados do embrião.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da oportunidade de estagiar na maior empresa de produção *in vitro* de embriões bovinos do mundo In Vitro Brasil S/A, exercendo práticas de conhecimentos teóricos adquiridos na Universidade Federal do Tocantins, absorvendo ainda mais conhecimento e sendo de total importância tanto para cumprimento do estágio curricular obrigatório quanto para a formação acadêmica como Zootecnista.

Todo o período de estágio permitiu conhecer as atividades exercidas na prática, sendo as mesmas laboratoriais, de fundamental importância profissional.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- RODRIGUES, C. F. M.; GARCIA, J. M. Fecundação *in vitro*: aplicação comercial. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v. 28, n. 1, p. 186-187, 2002.
- GONÇALVES, P. B.D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, p. 195-226, 2002.
- DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C.; UENO, V. G.; FERNANDES, C. E. The effect of sperm preparation and time of co-incubation on *in vitro* fertilization of *Bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 69, n. 1-2, p. 15-23, 2002.
- DODE, M. A. N. RODOVALHO, N.C.; UENO, V. G.; ALVES, R. G. O. Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 207-217, 2000.
- SANTOS, S. S. D.; DANTAS, J. K.; MIRANDA, M. S. et al. Cinética da maturação nuclear *in vitro* de oócitos bubalinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 39, p. 266-270, 2002.
- SUTTON-MCDOWALL, M. L.; FEIL, D.; ROBKER, R. L. et al. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v. 77, p. 1632-1641, 2012.
- BRACKETT R. G.; BOUSQUET D.; BOICE M. L.; DONAWICK W. J.; EVANS DRESSEL M. A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biol Reprod**, v. 27, p. 147-158, 1982.
- STEPTOE P. C.; EDWARDS R. G. Birth after reimplantation of human embryo. **Lancet**, v. 2, p. 366, 1978.
- CAROLAN C.; LONERGAN P.; VAN-LANGENDONCKT A.; MERMILLOD P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**. V. 43, p. 1115-1128, 1995.
- BURATINI JR J. Folliculogênese em bovinos. In: **II Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, 2, 2006, Londrina, PR. Anais... Londrina: UEL, 2006. p.55-62.
- 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. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**; v.32, p. 100-109, 2008.
- BOLS, P.E.J.; YSEBAETI, M. T.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**. v. 47, p.1221-1236, 1997.
- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reproduction in farm animal. 7.Ed. **Philadelphia:Lea & Febiger**, 509 p, 2000.