

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, INOVAÇÃO E NEGÓCIOS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Helen Brandalise Mazzarollo

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO TÉCNICO PROFISSIONAL EM MEDICINA
VETERINÁRIA**

Área: Reprodução Animal

Passo Fundo

2023

Helen Brandalise Mazzarollo

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO TÉCNICO PROFISSIONAL EM MEDICINA
VETERINÁRIA**

Área: Reprodução Animal

Relatório de Estágio Técnico Profissional apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção do grau de Médico(a) Veterinário(a), sob a orientação acadêmica do Prof. Dr. Fernando Pilotto.

Passo Fundo

2023

Helen Brandalise Mazzarollo

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO TÉCNICO PROFISSIONAL EM MEDICINA
VETERINÁRIA**

Área: Reprodução Animal

Relatório de Estágio Técnico Profissional apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção do grau de Médico(a) Veterinário(a), sob a orientação acadêmica do Prof. Dr. Fernando Pilotto

Aprovado em ___ de _____ de 20__

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ - UPF

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Dedico este trabalho aos meus pais,
Oswaldo Mazzarollo e Edita Brandalise
Mazzarollo que não mediram esforços
para a realização desta graduação tão
almejada desde criança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pela saúde e força todos os dias para continuar batalhando. Um agradecimento especial aos meus pais, Osvaldo Mazzarollo e Edita Brandalise Mazzarollo por nunca terem medido esforços em me oferecer as melhores oportunidades de estudo para que o sonho de ser Médica Veterinária pudesse ser concretizado, são fortes exemplos de personalidade e de garra e se um dia conseguir ser metade do que são, já estarei realizada.

Agradeço todo o corpo docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo que sempre foram muito mais que professores, foram amigos, que forneceram as melhores oportunidades de estudos e juntos criamos lindas memórias que serão levadas para a minha vida profissional e pessoal.

Devo um agradecimento também, a empresa Biotec Serviços de Apoio à Pecuária por me abrirem as portas para a realização do meu estágio curricular obrigatório e terem me acolhido muito bem, repassando seus conhecimentos e vivências com muita calma e tranquilidade, este período foi de grande valia para mim.

RESUMO

No período do Estágio Técnico Profissional Supervisionado (ETPS) foi possível aperfeiçoar e colocar em prática todo o conhecimento teórico adquirido durante a graduação em Medicina Veterinária, na área pretendida para atuação profissional. O ETPS foi realizado na área de reprodução e biotecnologias da reprodução, área de interesse da estagiária, sob orientação acadêmica do Professor Doutor Fernando Pilotto. O ETPS foi realizado na empresa Biotec Serviços de Apoio à Pecuária, localizada na cidade de Nova Prata, Rio Grande do Sul, no período de 24 de julho de 2023 à 30 de outubro de 2023 totalizando 546 horas, com supervisão local da Médica Veterinária Monique Frata. Através do ETPS, foi possível vivenciar a rotina laboratorial e do campo, acompanhando os médicos veterinários e técnicos laboratoristas no processo completo da produção de embriões bovinos *in vitro*, envase para congelamento *Direct Transfer* (DT), ou para transferência a fresco, aspiração folicular, coleta de embriões convencional e transferência de embriões descongelados. O presente relatório compreende a descrição do local de estágio e as atividades acompanhadas neste período, estando estas divididas entre os setores e etapas individuais de produção. Ao final, será relatado um caso de contaminação em placas de fecundação, cultivo e tubos de meio para maturação *in vitro* de oócitos. Como desfecho, o estágio técnico profissional supervisionado foi fundamental para o amadurecimento profissional e pessoal, através da oportunidade de vivenciar experiências dentro do laboratório e no campo. Conhecer a rotina laboratorial, interagir com pessoas diferentes, bem como acompanhar setores e profissionais especializados enriqueceram a visão da acadêmica sobre o futuro da profissão como Médica Veterinária.

Palavras-chave: PIVE. Biotecnologia. Envase. FIV. Maturação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráfico da produção mundial de embriões bovinos in vivo, in vitro e total.....	11
Figura 2 - Laboratório Biotec Serviço de Apoio à Pecuária. (A) Área interna do Laboratório. (B) Sala de lavagem e esterilização de materiais.	13
Figura 3 - Central de doadoras. (A) Tronco de manejo. (B) Mangueiras com curral anti-estresse.....	13
Figura 4 - Imagem ultrassonográfica focada nos folículos ovarianos da doadora.	16
Figura 5 - Material de Aspiração folicular - Ovum pick up (OPU).	16
Figura 6 - Estruturas encontradas após a OPU e antes de ocorrer a maturação. Em vermelho: Grau 1. Em amarelo: Grau 2.....	17
Figura 7 - Tubos de maturação de oócitos.....	17
Figura 8 - Materiais para uso no momento da FIV.....	18
Figura 9 - Gradiente de Percoll.	19
Figura 10 - Espermatozoides observados em microscopia no momento da avaliação da motilidade e vigor.....	19
Figura 11 - (A) Estruturas 18 a 22h após a FIV. (B) Estruturas pós lavagem e acondicionadas na placa de CIV.	20
Figura 12 - Classificação de embriões bovinos in vivo IETS.	21
Figura 13 - Esquema representativo do envase do embrião.	22
Figura 14 - (A) Embriões selecionados para o envase. (B) Embriões envasados e lacrados. ...	22
Figura 15 - Palhetas contendo os embriões.	23
Figura 16 - (A) Embriões no congelador. (B) Realização do Seeding.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades acompanhadas durante o estágio técnico supervisionado na Biotec Serviços de Apoio à Pecuária no período de 24 de julho a 30 de outubro de 2023.	14
Tabela 2 - Critérios para classificação de oócitos.	15

LISTA DE SÍMBOLOS, UNIDADES, ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
BE	Blastocisto eclodido
BI	Blastocisto inicial
BL	Blastocisto
BN	Blastocisto em eclosão
BX	Blastocisto expandido
CCO	Complexo cúmulus oócito
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CL	Corpo lúteo
CO ₂	Dióxido de carbono
D0	Dia zero
D3	Dia três
D6	Dia seis
D7	Dia sete
DG	Diagnóstico de gestação
DT	Transferência <i>Direct Transfer</i>
EG	Etileno glicol
ETP	Estágio técnico profissional
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HE	Heparina
IA	Inseminação artificial
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
kg	Kilogramas
LH	Hormônio luteinizante
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligramas
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitros
MO	Mórula
OPU	Aspiração folicular (<i>ovum pick up</i>)
O ₂	Oxigênio
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PHE	Penicilamina-Hipotaurina-Epinefrina
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SOV	Superovulação
TCM 199	Meio de Cultivo Tecidual 199 (<i>Tissue Culture Medium 199</i>)
TE	Transferência de embriões
ZP	Zona pelúcida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	12
2.1 BIOTEC SERVIÇOS DE APOIO À PECUÁRIA	12
2.2 LABORATÓRIO	12
2.3 CENTRAL DE DOADORAS	12
3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	14
3.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIVE).....	14
3.1.1 Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	17
3.1.2 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	18
3.1.3 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	20
3.1.4 Clivagem (D3) e Avaliação embrionária (D6)	20
3.1.5 Envase a Fresco (D7).....	22
3.1.6 Congelamento <i>Direct Transfer</i> DT (D7)	23
3.1.7 TE/Descongelamento	24
4. RELATO DE CASO.....	26
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	31
6. REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

As fêmeas bovinas são classificadas como monovulatórias, sendo essa característica determinante no seu impacto genético dentro do rebanho, visto que fisiologicamente geram de seis a oito crias durante sua vida reprodutiva (GONÇALVES *et al*, 2021). Desta forma, surgiu a necessidade de aumentar a produtividade de rebanhos bovinos através da multiplicação intensiva da genética de fêmeas superiores, estimulando a criação de novas técnicas de reprodução assistida, para trazer maior lucratividade e desempenho na bovinocultura. A primeira técnica a revolucionar este mercado foi a Inseminação Artificial. Posteriormente, foi desenvolvida a produção de embriões *in vivo*, ou Transferência de Embriões (TE convencional), em que a doadora é superovulada, inseminada e os embriões são coletados por lavagem uterina.

Segundo Silva (2020), citado por Pazzim (2021) o Brasil apresentou as primeiras produções de embriões *in vivo* no ano de 1980 e alguns anos após já era considerado uma referência mundial nesta atividade. Anos mais tarde, o país também foi pioneiro na produção *in vitro* de embriões (PIVE) comercial, devido ao fato de o rebanho nacional ser composto majoritariamente por zebuínos, que apresentam muitos folículos antrais, tornando assim a PIVE viável. Isso trouxe praticidade e diminuição dos custos de produção, principalmente por não ser necessário o tratamento superovulatório em zebuínos, potencializando a produção de embriões por doadora e acelerando o melhoramento genético da raça. No entanto, raças taurinas apresentam menor população folicular e ainda se beneficiam da TE convencional, sendo os embriões oriundos desta técnica mais resistentes à criopreservação.

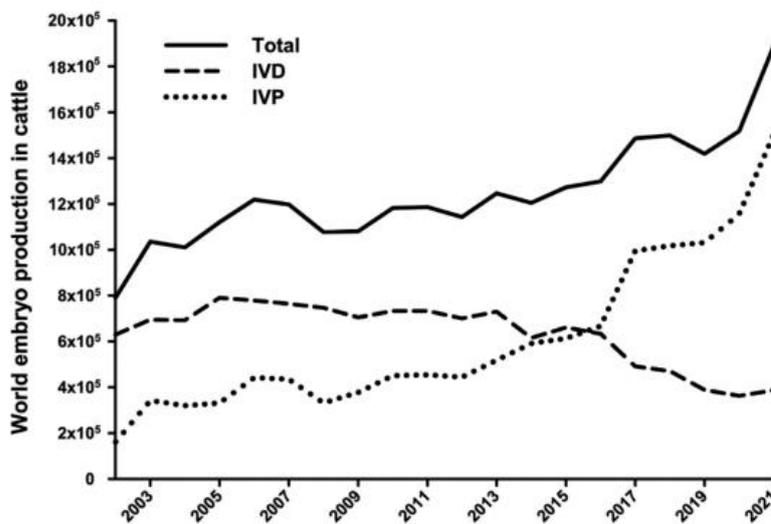
Brevemente, para a produção *in vivo* de embriões, as doadoras têm o ciclo estral previamente sincronizado para a indução de um cio base. Entre o 8º a 12º dia após a data do cio é feita uma avaliação ginecológica para detectar a presença de um corpo lúteo (CL). As fêmeas que não possuem CL são retiradas da superovulação (SOV), enquanto as aptas têm sua dose de hormônio folículo estimulante (FSH) determinada individualmente de acordo com sua categoria, raça e resposta obtida em SOVs anteriores. Na sequência, ocorre a SOV, que consiste na aplicação de 8 doses decrescentes de FSH, sendo aplicado concomitantemente às duas últimas doses de FSH a prostaglandina para lise do CL e manifestação do estro. O estro é observado e no momento de sua detecção é aplicada uma dose de GnRH. A primeira IA é realizada 12h após o GnRH e a segunda IA 12h após a primeira. Sete dias após, é realizada a coleta através da lavagem uterina. O lavado é observado em estéreo-microscópio para a busca das estruturas coletadas. A seguir, classifica-se os embriões de acordo com as normas da

IETS, sendo também anotado o número de não fecundados e degenerados. Os embriões são lavados e envasados para TE a fresco ou congelados.

Por outro lado, a PIVE ocorre totalmente em ambiente laboratorial, sendo composta pelas seguintes etapas: aspiração folicular (*ovum pickup* – OPU) para coleta dos complexos *cumulus*-oócito (CCO), maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV), cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos até os estágios de blastocisto, TE ou criopreservação.

Sendo assim, caracterizadas por gerar um maior aproveitamento de células germinativas perdidas por conta da atresia folicular (GONÇALVES *et al.* 2021). A PIVE e a TE tem como objetivo melhorar a quantidade de prenhez obtidas de fêmeas geneticamente superiores, quando comparada a outras Biotécnicas reprodutivas, como a IA. Abaixo, a figura 1 representa a produção mundial de embriões bovinos *in vivo* e *in vitro*. Nota-se que a partir de 2015 a produção *in vitro* de embriões ultrapassou a produção *in vivo* (VIANA, 2022).

Figura 1 - Gráfico da produção mundial de embriões bovinos *in vivo*, *in vitro* e total.



Fonte: Viana, 2022.

Devido à grande relevância desta atividade, O ETP foi realizado na empresa Biotec Serviços de Apoio à Pecuária, localizada em Nova Prata/RS, disponibilizando serviços na área de reprodução bovina e melhoramento genético. Principalmente na área de produção e transferência de embriões.

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

2.1 BIOTEC SERVIÇOS DE APOIO À PECUÁRIA

Biotec Serviços de Apoio à Pecuária é uma empresa localizada na serra gaúcha e tem como principal atividade a produção de embriões *in vivo* e *in vitro*. Conta com estruturas que seguem as normas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com o intuito de atender as exigências do mercado. Possui treze profissionais atuando nos diversos setores que envolvem a empresa.

2.2 LABORATÓRIO

O Laboratório da Biotec estima por um trabalho de extrema qualidade, com protocolos e produtos de confiança, além de técnicos capacitados para exercer todos os serviços e entregar os resultados almejados ao final. Situado na cidade de Nova Prata, Rio Grande do Sul, funciona de segunda a sexta-feira, das 8:00 às 18:00 horas, realizando todas as etapas da produção *in vitro* de embriões. Conta com uma estrutura composta por escritório, almoxarifado, sala de lavagem e esterilização de materiais e laboratório de produção de embriões e preparação de meios (Figura 2).

2.3 CENTRAL DE DOADORAS

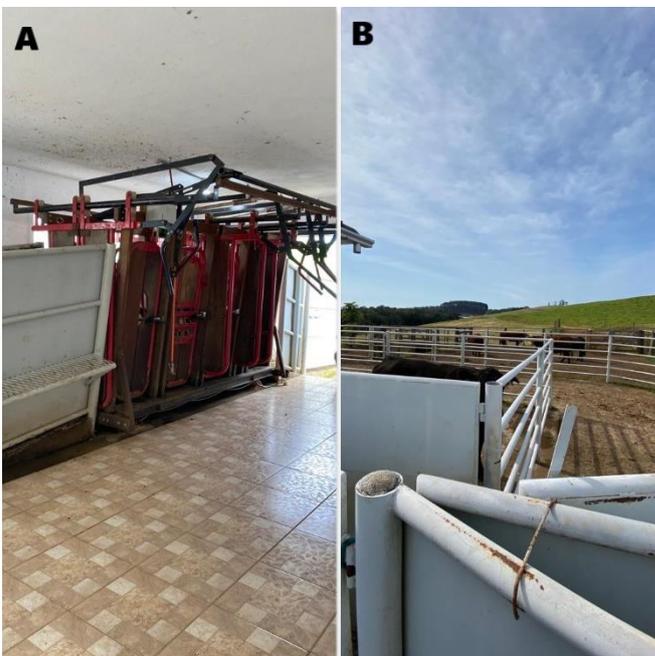
A empresa possui uma central de doadoras localizada no interior da cidade de Protásio Alves, Rio Grande do Sul (Figura 3). Este local tem o intuito de hospedar animais de criadores que desejam manter o regime de produção intensiva de embriões, facilitando o manejo. O ponto mais importante é garantir o bem-estar dos animais, fornecendo-os uma estadia tranquila, com alimentação adequada, manejo seguro, controle sanitário e entre outros fatores.

Figura 2 - Laboratório Biotec Serviço de Apoio à Pecuária. (A) Área interna do Laboratório. (B) Sala de lavagem e esterilização de materiais.



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Figura 3 - Central de doadoras. (A) Tronco de manejo. (B) Mangueiras com curral anti-estresse.



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante a realização do Estágio Técnico Profissional (ETP), foi possível acompanhar a rotina laboratorial da produção *in vitro* de embriões bovinos e algumas atividades a campo. No laboratório foi acompanhado todo o processo da PIVE, desde a maturação (MIV), fecundação (FIV), cultivo (CIV), clivagem (CLIV/D3), previsão (D6), envase de embriões para congelamento lento (D7) e transferência a fresco (D7), seleção e classificação embrionária. No campo foram acompanhados alguns processos que fazem parte dos serviços prestados, como aspiração folicular (OPU) e transferência de embriões descongelados. Ademais, a empresa realiza coleta de ovários de abatedouros para treinamento das técnicas realizadas na produção comercial e para experimentos.

Tabela 1 - Atividades acompanhadas durante o estágio técnico supervisionado na Biotec Serviços de Apoio à Pecuária no período de 24 de julho a 30 de outubro de 2023.

Atividades acompanhadas		
Atividades	Número	Porcentagem
PIVE	745	25%
Congelamento DT	1722	59%
Envase de embriões a fresco	225	8%
Aspiração folicular	110	4%
Transferência de embriões descongelados	115	4%
Total	2.917	100%

Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

3.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)

A PIVE vem ganhando cada dia mais espaço no mercado de genética, pois esta biotécnica além de aumentar a quantidade de crias de uma fêmea bovina, possibilita que fêmeas com problemas reprodutivos possam continuar se reproduzindo, também otimiza o uso de sêmen de alto valor e é possível o aproveitamento de oócitos obtidos de ovários logo após ao abate.

O início do programa da PIVE consiste na contenção das doadoras previamente selecionadas em tronco de manejo, posteriormente é executada a palpação retal para verificar as condições do ovário. Caso esteja apta, é realizada a lavagem da região perineal com água e feita a anestesia epidural baixa com 5mL de lidocaína. Nesta etapa, um auxiliar faz a abertura dos lábios vulvares e então a guia de aspiração acoplada com o transdutor micro convexo é inserida até o fundo do saco vaginal, juntamente com auxílio da manipulação retal, são posicionados os ovários de forma visível no ultrassom (MARIANO, 2015) (Figura 4). Conforme os folículos são identificados, imediatamente são aspirados devido à pressão negativa exercida pela bomba de vácuo que levará os oócitos da agulha através da linha de aspiração até um tubo de 50 mL com meio PBS suplementado de heparina, SFB e aquecido (Figura 5).

Logo após o processo de aspiração o material coletado é enviado ao laboratório de campo. Na sequência, ocorre a lavagem com solução PBS em um filtro de 100 µm até que o conteúdo se torne translúcido. O que remanesceu no filtro é depositado em placas de Petri de 60 mm, para a busca e seleção das estruturas. Segundo Gonçalves *et al.* (2021) as estruturas podem ser classificadas de acordo com características do *cumulus* e do citoplasma do oócito:

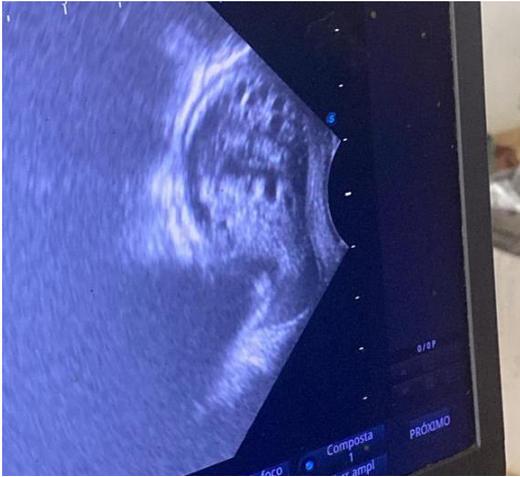
Tabela 2 - Critérios para classificação de oócitos.

Classificação	Descrição
1	As células do <i>cumulus</i> são compactas e contém mais de três camadas. O citoplasma possui granulações homogêneas e sua zona pelúcida (ZP) tem seu interior preenchido.
2	As células do <i>cumulus</i> estão parcialmente compactas, tendo menos de 3 camadas celulares. O citoplasma pode ser heterogêneo, se concentrando no centro ou na periferia da ZP.
3	As células do <i>cumulus</i> apresentam-se expandidas. O citoplasma pode estar degenerado, contraído ou fragmentado, pode ter espaço entre a membrana da célula e a zona pelúcida.
4	Oócito apresenta-se desnudo e sem <i>cumulus</i> celular.

Fonte: Gonçalves *et al.*, 2021.

Após este processo, as estruturas são alocadas em tubos com meio de maturação *in vitro* (MIV) e transportados ao laboratório, em que seguirão os processos da PIVE. A figura 6 representa a classificação oocitária após OPU. As etapas de maturação envolvem algumas transformações moleculares e citoplasmáticas, como síntese proteica, reorganização de organelas, que tornarão o gameta feminino apto à fecundação e à sequência do desenvolvimento embrionário (GONÇALVES *et al.*, 2021).

Figura 4 - Imagem ultrassonográfica focada nos folículos ovarianos da doadora.



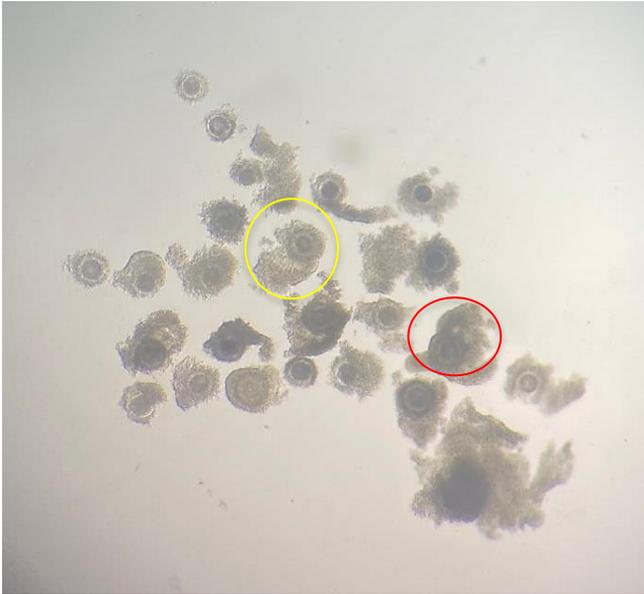
Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Figura 5 - Material de Aspiração folicular - Ovum pick up (OPU).



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Figura 6 - Estruturas encontradas após a OPU e antes de ocorrer a maturação. Em vermelho: Grau 1. Em amarelo: Grau 2.



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

3.1.1 Maturação *in vitro* (MIV)

Maturação é o nome dado ao processo de alterações citoplasmáticas, nucleares e moleculares em que ocorre a formação do oócito na fase antral (SOUZA, 2021. WARD et al., 2002). As estruturas selecionadas e enviadas ao laboratório ficam armazenadas em micro tubos contendo meio TCM-199 suplementado com 10% de SFB e coberto por óleo mineral (Figura 7), sendo previamente identificadas com os dados da doadora. Estes tubos são alocados em incubadora de alta tensão de O₂ a 38°C, 5,5% de CO₂ e umidade saturada por vinte a vinte e quatro horas, para posteriormente ocorre o processo de fecundação *in vitro* (FIV). A empresa trabalha com a metodologia de alocar até trinta estruturas por tubo.

Figura 7 - Tubos de maturação de oócitos.

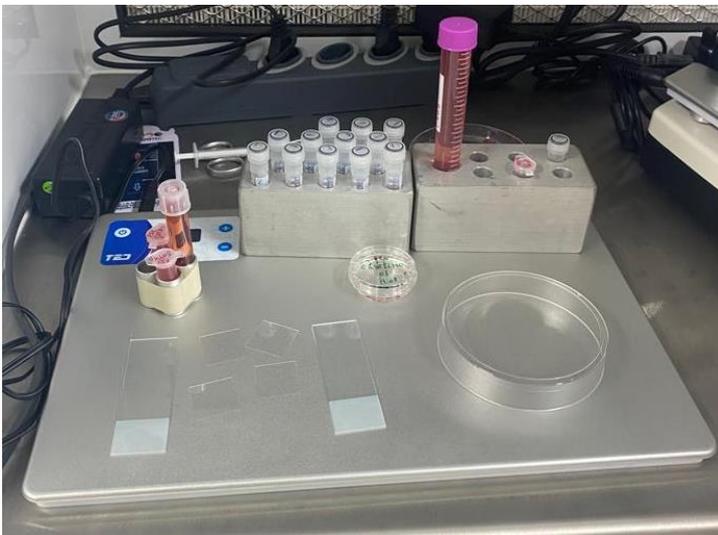


Fonte: Arquivo pessoal, 2023

3.1.2 Fecundação *in vitro* (FIV)

O processo de fecundação consiste na capacitação do espermatozoide para adentrar na zona pelúcida do oócito. Este é o primeiro contato entre os gametas para dar início a formação do embrião. As atividades acontecem de vinte duas a vinte quatro horas após a OPU. Nesta etapa ocorre a lavagem dos CCO e concomitantemente a preparação do sêmen (SOUZA, 2021). Os oócitos são retirados dos tubos de MIV, lavados e distribuídos nas gotas de meio FIV numa placa de 35mm, onde ocorre a inseminação e co-cultivo com espermatozoides por dezoito a vinte e duas horas.

Figura 8 - Materiais para uso no momento da FIV.

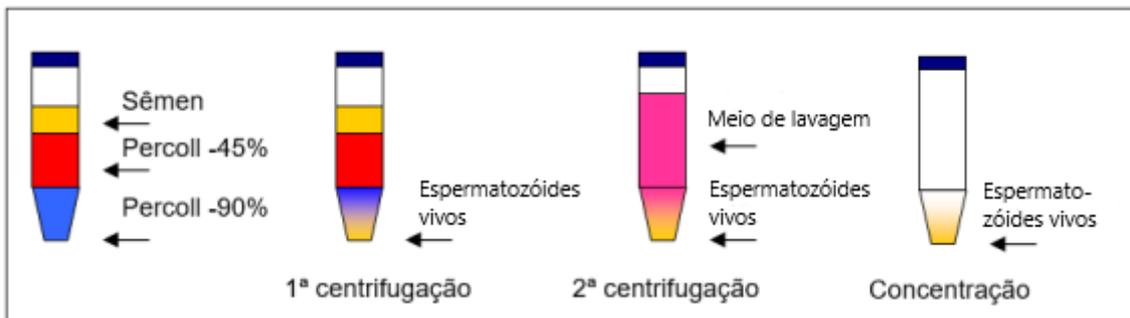


Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Para a preparação do sêmen é necessário a utilização do gradiente de Percoll, o qual possui a finalidade de separar os espermatozoides mortos e diluente seminal dos espermatozoides vivos. (ADONA *et al.*, 2017). Em um micro tubo de 1,5 mL deposita-se o e Percoll 45% e posteriormente é adicionado o Percoll 90% ao fundo, constituindo assim o gradiente 45-90% que fica na placa aquecedora a 37°C (Figura 9). Enquanto isso, descongela-se o sêmen por 45 segundos a 37°C, logo após o sêmen é despejado no sobre o gradiente de 45%. O próximo passo é a centrifugação a 9000rpm durante dois minutos. Finalizado o este processo, retira-se o sobrenadante, deixando apenas o pellet de sêmen no fundo do tubo. Este pellet é ressuscitado em um novo micro tubo com meio de FIV para lavagem, sendo centrifugado mais uma vez por um minuto. Novamente retira-se o sobrenadante, deixando em torno de uma parte de meio para uma parte de pellet de sêmen no fundo do micro tubo.

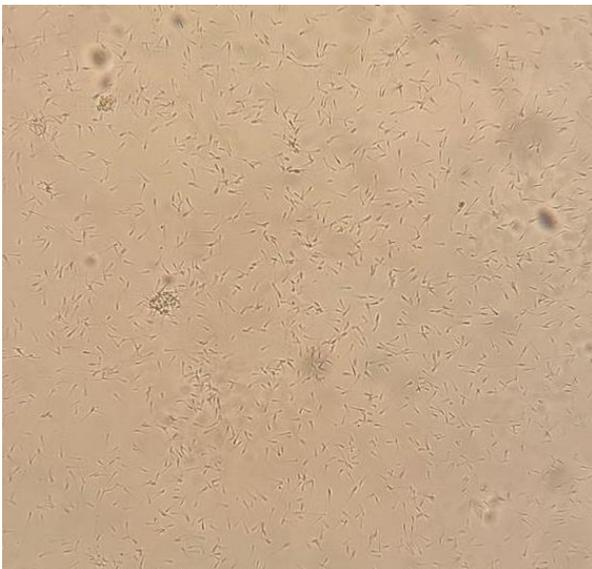
Homogeneiza-se a solução e retira-se uma amostra para avaliação da motilidade (calculada em porcentagem) e o vigor (caracterizado de 1 a 5) (Figura 10). Com base na qualidade do sêmen determina-se de forma subjetiva a dose inseminante. A capacitação espermática ocorre na gota de meio FIV junto aos CCO, visto que este meio é acrescido de Heparina e PHE. O co-cultivo ocorre em incubadora de alta tensão de O₂ a 38°C, 5,5% de CO₂ e umidade saturada durante dezoito a vinte e duas horas. A próxima etapa realizada é o cultivo *in vitro*.

Figura 9 - Gradiente de Percoll.



Fonte: ADONA, *et al.*, 2017.

Figura 10 - Espermatozoides observados em microscopia no momento da avaliação da motilidade e vigor.

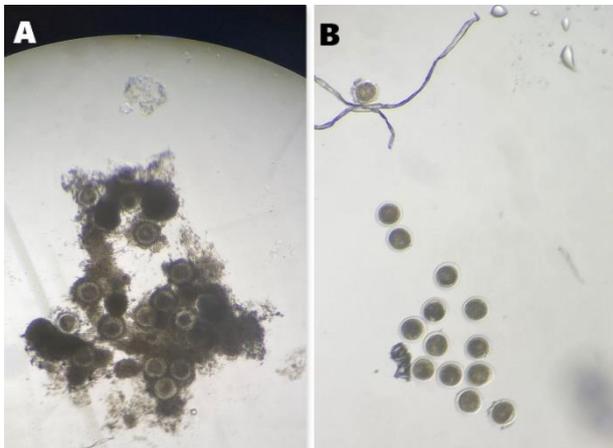


Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

3.1.3 Cultivo *in vitro* (CIV)

Cultivo *in vitro* compreende o desenvolvimento do zigoto até a formação do blastocisto (SANGILD *et al.*, 2000). Neste período ocorre ativação do genoma, compactação dos blastômeros, formação do blastocele e o rompimento da zona pelúcida (GONÇALVES *et al.*, 2021). O CIV inicia com a lavagem separação dos zigotos e espermatozoides. Os zigotos são lavados cuidadosamente com meio CIV e acondicionados na placa de CIV (Figura 11), em incubadora de baixa tensão de O₂, a 38,5°C, 5,5% de CO₂ e 5% de O₂ com umidade saturada, durante quarenta e oito horas.

Figura 11 - (A) Estruturas 18 a 22h após a FIV. (B) Estruturas pós lavagem e acondicionadas na placa de CIV.



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

3.1.4 Clivagem (D3) e Avaliação embrionária (D6)

A avaliação de clivagem, a qual a empresa realiza quarenta e oito horas após os zigotos ingressarem no CIV, é a parte onde as estruturas fecundadas já passaram por algumas divisões celulares podendo ter duas, quatro ou oito células. As estruturas não fecundadas podem ser retiradas da gota de cultivo. Nesta etapa eventualmente podem ser detectadas contaminações fúngicas oriundas da OPU ou bacterianas quando o sêmen está contaminado, sendo necessário tomar medidas de contenção e tratamento.

Ao sexto dia é feita a primeira avaliação embrionária podendo visualizar já a compactação dos blastômeros e início da formação do blastocele (THOMPSON, 2000). Nesta etapa é feita uma previsão do que poderá ser congelado ou transferido a fresco no sétimo dia (D7), informando o cliente sobre como está o andamento da produção.

Nesta avaliação, fazem parte da contagem mórulas (MO), blastocistos iniciais (BI) ou até mesmo na forma de blastocisto (BL) e blastocisto expandido (BX). Segundo Viana (2009) algumas características são consideradas na progressão do desenvolvimento do embrião como número, tamanho e o grau da compactação dos blastômeros, formação da blastocèle e espessura da zona pelúcida.

A sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) utiliza uma classificação de etapa de desenvolvimento de forma numérica, em que é considerado 1 (oócito não fecundado) até 9 (blastocisto eclodido e expandido), conforme a figura 12. Já a classificação da qualidade dos embriões usa códigos que vão de 1 (embriões de qualidade excelente ou boa) até 4 (embriões mortos ou degenerados).

Figura 12 - Classificação de embriões bovinos *in vivo* IETS.

Classificação de embriões bovinos produzidos *in vivo* de acordo com o estágio de desenvolvimento

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

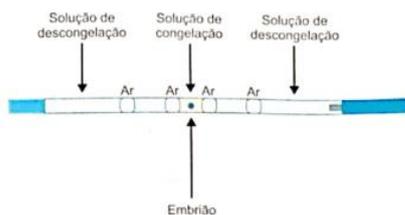
3.1.5 Envase a Fresco (D7)

No sétimo dia de cultivo *in vitro* é realizada a destinação dos embriões, que podem ser pelo método de congelamento lento (*Direct Transfer*) ou envase para transferência a fresco.

O processo consiste em realizar a classificação dos embriões a serem envasados quanto ao seu desenvolvimento (Mórula - MO, Blastocisto inicial - BI, Blastocisto - BL, Blastocisto expandido - BX, Blastocisto em eclosão – BN e Blastocisto eclodido - BE) e qualidade.

O envase dos embriões é realizado em palhetas de 0,25mL acopladas com seringas de insulina. Nas palhetas irão conter um meio específico para envase e bolhas de ar, com a finalidade de não ocorrer a perda do embrião ao tirar o lacre no momento da transferência

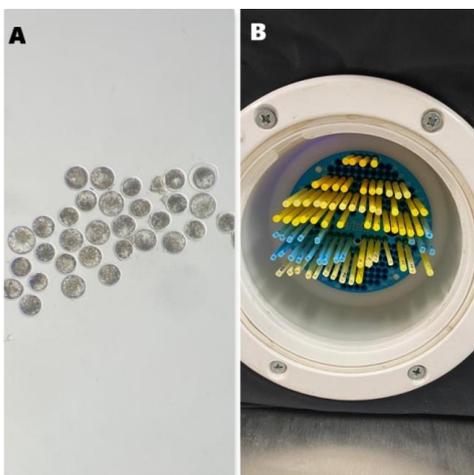
Figura 13 - Esquema representativo do envase do embrião.



Fonte: Gonçalves, *et al.*, 2021.

Depois de envasada, cada palheta é lacrada com um lacrador numerado correspondente ao acasalamento e armazenado na transportadora de embriões em uma temperatura média de 36°C.

Figura 14 - (A) Embriões selecionados para o envase. (B) Embriões envasados e lacrados.



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Assim, os embriões estão prontos para serem transportados para a fazenda, onde ocorrerá o processo de transferência. Todos os dados são anotados em formulários para que haja controle das atividades.

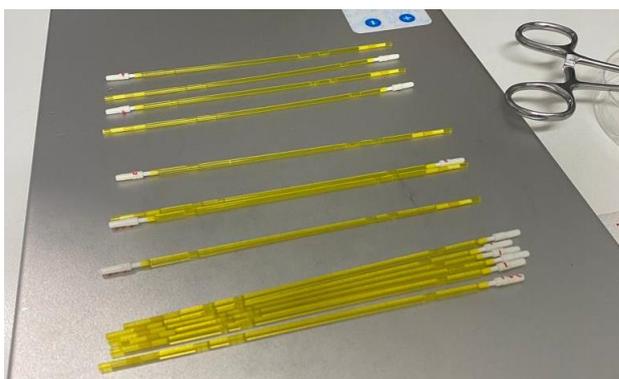
3.1.6 Congelamento *Direct Transfer DT (D7)*

O processo de congelamento consiste em uma ação lenta, em que os embriões são envasados com a utilização de um crio protetor a base de etileno glicol (EG), que realiza um processo de desidratação no embrião. O mesmo permite que no processo de descongelamento, no momento da transferência da receptora, seja de maneira muito prática.

Em uma placa de quatro poços, é adicionado etileno glicol que fica aquecendo e aguardando a lavagem dos embriões. O congelador então é ligado e adicionado nitrogênio, em que ficará aguardando a entrada das palhetas em uma temperatura de -7°C . Os embriões são avaliados, selecionados, removidos da placa de CIV e lavados. Após a lavagem os embriões são transferidos para a placa de quatro poços com EG e neste momento é iniciado o cronômetro.

O processo de envase se torna semelhante ao do envase a fresco, realizado em palhetas de 0,25mL acopladas com seringas de insulina. Depois de envasada, cada palheta é lacrada com um lacrador numerado correspondente ao número da vaca.

Figura 15 - Palhetas contendo os embriões.

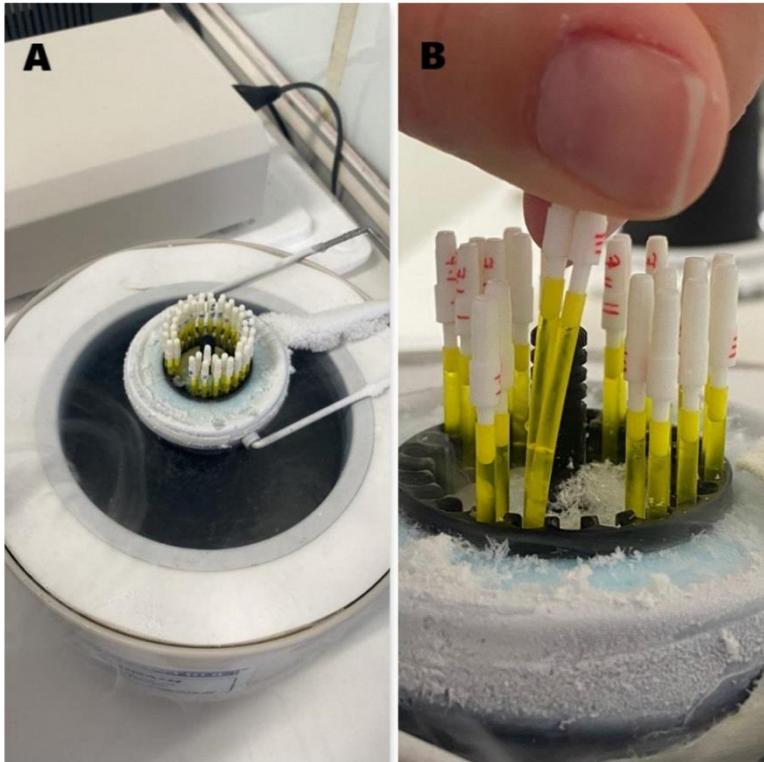


Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Passados em torno de 9 minutos do início da cronometragem os embriões são levados ao congelador. Dois minutos após a entrada dos embriões realiza o *Seeding*, ou seja, indução da cristalização e dará início ao congelamento do embrião (GONÇALVES et al., 2021). Ao final desta etapa é iniciada a curva de resfriamento até alcançar os $-32,0^{\circ}\text{C}$ em um tempo que

irá variar de acordo com o equipamento utilizado. Os embriões devidamente congelados então são armazenados em botijões contendo nitrogênio e identificados adequadamente conforme o controle da empresa.

Figura 16 - (A) Embriões no congelador. (B) Realização do Seeding.



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Na empresa não é mais realizado o processo de vitrificação de embrião. Apesar da técnica consistir em um método ultrarrápido de congelamento, em que não são necessários gastos com a compra de um congelador, somente com a utilização de meios e de nitrogênio, é considerado pela empresa menos prático. Assim, o método *Direct Transfer* trouxe resultados mais satisfatórios e mais praticidade no manejo com os embriões.

3.1.7 TE/Descongelamento

Ao final de todo o processo, os embriões que passaram pelo processo do congelamento lento, poderão então sofrer o processo de descongelamento para serem transferidos na receptora apta. As receptoras deverão ser animais saudios, bem nutridos, ter bom temperamento, de fácil manejo e de um porte compatível com a raça do embrião.

Estes animais devem passar por um processo de sincronização de cio, para que possam receber o embrião no dia correspondente ao ambiente uterino ideal à fase de desenvolvimento embrionária. O protocolo dá início no dia zero (D0) com inserção de dispositivo intravaginal de progesterona e aplicação do hormônio benzoato de estradiol, pela via intramuscular. Sete dias após remove-se o dispositivo intravaginal e realiza-se a aplicação do hormônio prostaglandina e um indutor de ovulação, podendo ser cipionato de estradiol, benzoato de estradiol ou GNRH. Depois de sete dias da data do cio, ocorre então o processo de transferência dos embriões descongelados.

No momento da inovulação faz-se a avaliação de cada animal para ver a relação do corpo lúteo com o ovário. Segundo Nogueira (2013) são considerados os seguintes estágios 1: CL maior do que o ovário, 2: CL aproximadamente do mesmo tamanho que o ovário e 3: CL menor que o ovário, ademais avalia-se o lado em que houve a ovulação (D= direito, E = esquerdo).

Concomitantemente a este processo avaliativo, os embriões vão sendo descongelados. O embrião é retirado do botijão de armazenamento e permanece por dez segundos no ar, logo após é colocado na água em uma temperatura em torno de 30°C e permanece por trinta segundos. Dado o tempo necessário para descongelar, os dados do embrião são anotados em um formulário de controle e a palheta é adicionada na bainha, juntamente com o aplicador e revestida com uma camisa sanitária descartável. Então, um auxiliar faz a abertura dos lábios vulvares para a introdução do aplicador que é direcionado para o corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo.

Após esse processo, o animal manejado é solto do tronco de contenção e deve passar pela menor quantidade de estresse possível, visando garantir a efetividade da transferência. Ademais, em torno dos trinta dias após a transferência dos animais é feita a avaliação através de ultrassonografia para a confirmação da prenhez das receptoras. Um segundo DG é feito aos 60 dias, a fim de confirmar a prenhez e fazer a prestação de serviço, por prenhez confirmada aos 60 dias.

4. RELATO DE CASO

SURGIMENTO DE CONTAMINAÇÕES NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

HELEN BRANDALISE MAZZAROLLO ¹

FERNANDO PILOTTO ²

¹Graduanda do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo

²Docente do Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo.

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões foi desenvolvida com o intuito de melhorar e aumentar a quantidade de descendentes de uma fêmea bovina, ao longo de sua vida reprodutiva. Para que tal processo pudesse ser tão utilizado no mundo, houveram inúmeras pesquisas com o propósito de aperfeiçoar cada vez mais as técnicas de produção. Pode-se destacar as boas práticas de laboratório, que visam a segurança das pessoas envolvidas e a segurança dos produtos que serão manejados, com isso é possível prevenir que uma série de agentes como fungos e bactérias adentrem no espaço de trabalho e cause prejuízos na produção.

Palavras-chave: Reprodução. PIVE. Oócitos. Boas práticas. Embrião. Contaminações.

INTRODUÇÃO

Para o sucesso de uma produção de embriões, além do comprometimento e dedicação, há outros aspectos que merecem atenção, existem algumas normas de limpeza e biosseguridade que foram desenvolvidas pensando em diminuir os riscos de sujidades, contaminações, entre outros, que podem vir a adentrar nas estruturas do laboratório e dos materiais utilizados. Segundo Esteves (2017) o principal ponto a se analisar em um laboratório é a qualidade do ar. Ademais, o número de pessoas, roupas utilizadas e a troca delas, os materiais que são utilizados, lavagem e esterilização, a movimentação de muitas pessoas também pode ter um impacto crítico.

Caso haja alguma divergência nestes quesitos, pode haver a presença de agentes externos que venham a causar alguns prejuízos na produção. Em alguns casos, é possível acontecer a perda total ou parcial da produção de embriões, isto depende de como os agentes irão agir nos meios de cultivo embrionário e como afetarão os embriões presentes neste ambiente.

RELATO DE CASO

Durante a realização do ETP na empresa Biotec, no período de julho a outubro de 2023, foi possível presenciar o surgimento de contaminações em etapas variadas da produção de embriões *in vitro*. Ressalta-se que nesta época a umidade ambiental no laboratório de campo e sala de cultivo é mais elevada, propiciando a disseminação de agentes prejudiciais.

Em uma determinada produção, foi visualizado no terceiro dia do CIV, no momento da avaliação da clivagem a aparição de um artefato diferente das células do *cumulus* remanescentes normais. Foram três placas acometidas, porém apenas algumas gotas variadas, inclusive algumas que não apresentavam estruturas. O aspecto desta contaminação remetia a leveduras e os zigotos embora rodeados pelo contaminante, não pareciam degenerados. Como tomada de decisão, o primeiro passo foi lavar todos os zígotos e realizar troca de placas, analisando os próximos passos no decorrer dos dias. No dia seguinte, quarto dia, manteve-se a contaminação. Neste momento optou-se por realizar uma nova lavagem, contendo o antifúngico Anfotericina B, para tentar conter a contaminação, algumas estruturas degeneradas ou com fungo aderido à zona pelúcida acabaram sendo eliminadas. O acompanhamento seguiu nos dias subsequentes, para a avaliação dos embriões e foi possível realizar o congelamento lento de alguns embriões de melhor qualidade, enquanto os mais afetados não foram aproveitados. Lâminas contendo amostras do material foram feitas para a visualização no microscópio, em que era possível visualizar algumas estruturas móveis com aspecto leveduriforme, mas não foi possível caracterizá-las e diagnosticá-las, visto que o laboratório não possui kit para coloração deste material.

Em uma segunda produção, os acontecimentos foram parecidos. No momento em que foi perceptível as contaminações, no dia da clivagem, o processo decorreu da mesma forma em que a primeira vez, lavagem e a troca por uma placa nova, neste caso eram cinco placas totais e três apresentaram mudanças. No decorrer dos dias, também houve o tratamento com Anfotericina B como medida de controle e avaliação do crescimento dos embriões, até o dia

do congelamento. Coincidentemente, as contaminações aparecem em gotas fecundadas com o mesmo touro, o que pode levar a suspeita de ter sido transmitida através deste. Foram feitas análises no laboratório, dos meios que já haviam sido utilizadas nesta produção, ou seja, de fecundações e de cultivo antes da troca e as aparições tinham formas de “teias de aranha”, ou seja, surgimento de fungo filamentosos apenas nas placas. Ao realizar as lâminas com o material, o aspecto foi um pouco diferente do que visto primeiramente, mas também não foi possível diagnosticar ali. Por sorte, nesses dois casos, não houve a perda total dos embriões, o que pode ser comum na presença de agentes como este.

Em um terceiro processo de produção de embriões, foi possível perceber uma modificação na coloração em um tubo de maturação *in vitro*. A descoberta se deu na análise rotineira que a empresa realiza dos materiais que já foram utilizados, ou seja, foi percebido dias após o processo, as estruturas já tinham sido retiradas dos tubos. Os demais tubos permaneceram na cor alaranjada, que para os padrões da empresa é a cor normal e outro foi modificado para rosa, indicando que havia metabolismo e acidificação do meio. Com esta descoberta, foi acompanhado a produção e o crescimento dos demais embriões e daqueles que seriam correspondentes ao tubo com a coloração diferente, mas nenhum apresentou algum tipo de modificações, a produção de embriões permaneceu normal e foi de grande sucesso.

Em um caso de insucesso, houve morte de todos os embriões por contaminação bacteriana aparente no CIV. Uma doadora acasalada com um touro, apresentou aspecto gelatinoso do meio após as 22h da FIV e os espermatozoides estavam mortos. A lavagem foi feita cuidadosamente e as estruturas colocadas na placa de CIV. Porém no D3, as estruturas encontravam-se totalmente degeneradas com uma “areia” ao seu redor. Foi coletada uma alíquota da contaminação e esta gota foi removida da placa, a fim de evitar a contaminação das demais, que foram inseminadas com outro touro e estavam normais. Esta amostra foi enviada ao laboratório universitário, que identificou uma contaminação por enterobactéria multirresistente aos antibióticos comumente usados na PIVE (penicilina, gentamicina, amicacina, estreptomina e tobramicina). Uma amostra do sêmen também foi enviada e o mesmo contaminante foi isolado.

Somente estes casos foram vivenciados na rotina laboratorial durante o período na empresa, graças ao grande empenho dos técnicos e médicos-veterinários em garantir as boas práticas laboratoriais e a biossegurança, eventos como estes não se tornam comuns.

DISCUSSÃO

Os agentes que podem causar contaminações na produção *in vitro* de embriões podem ser os mais variados. A maioria dos relatos estudados se dá por contaminações que ocorrem no sêmen do touro que será usado na fecundação, ou seja, ocorrem falhas no manejo, coleta ou envase do sêmen que trazem estes agentes juntos, trazendo prejuízos a PIVE. Segundo Piccolomini (2015) em um estudo feito com produção *in vitro* utilizando um sêmen contaminado com enterobactérias e outro sem contaminação, houve diferença significativa na taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário, o que pode ter sido causado pela presença das bactérias por elas competirem com o mesmo substrato do embrião.

No caso das enterobacterias, elas são bactérias gram negativas, em forma de bacilos e podem estar presentes no trato urogenital, causando infecções. Suspeita-se que a causa pode ter sido por uma falha no processamento do sêmen, o qual deveria vir com garantia no seu processamento. Causando assim morte dos embriões, por apresentar endotoxinas. Com as amostras testadas foi possível identificar que este agente era resistente a todos os possíveis antibióticos utilizados na rotina, não restando opções de tratamento para evitar a mortalidade dos zigotos.

Em caso da presença de fungos, muitas vezes o motivo pode ser algum descuido ocorrido no laboratório de campo. Nem todas as propriedades trabalhadas possuem o melhor ambiente, com todas as medidas de biosseguridade para que o laboratório de campo seja montado, então por vezes a porta de entrada pode ser esta. Quando este é o caso, normalmente se observa o crescimento fúngico nos tubos de MIV após alguns dias. Muitas vezes o aparecimento de fungo na MIV não se torna contaminação no CIV, visto que a lavagem eficaz das estruturas antes de FIV e no CIV pode ser suficiente para remover todas as células contaminantes. No entanto, quando a carga infectante é alta, embora ainda não seja visível no estereomicroscópio, as lavagens padrão podem não ser o suficiente para impedir sua chegada no CIV, onde o fungo tem mais tempo para o desenvolvimento e causa seus danos principalmente devido à competição por nutrientes do meio.

CONCLUSÃO

Com base no que foi vivenciado durante o período de estágio, foi possível concluir que, no caso dos fungos, devido ao seu crescimento lento é mais difícil identificar sua origem. Pois, se o fungo veio do ambiente da OPU através do tubo de MIV ou do sêmen (FIV), só irá

ser visível no terceiro dia do CIV. Já no caso da contaminação bacteriana, os primeiros sinais são mais rápidos, como o meio com aspecto gelatinoso e todos espermatozoides mortos ao final da FIV e geralmente o desfecho é fatal, devido à resistência bacteriana. É importante ressaltar que em alguns casos ocorre a perda total da produção, mas em outros é possível ter um aproveitamento. O mais importante a ser feito dentro do laboratório são os cuidados com a limpeza e esterilização dos materiais, dos ambientes, dos fluxos, cuidados com roupas externas e sempre a utilização dos equipamentos de segurança pessoal, que neste caso, auxiliam na não transmissão de possíveis fungos ou bactérias.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a realização do Estágio Técnico Profissional realizado e toda a bagagem adquirida, tanto profissional quanto pessoal, concluo que, a produção *in vitro* de embriões vem crescendo cada dia mais no Brasil e no mundo, superando até mesmo a produção *in vivo*. A atividade é um grande avanço para garantir o melhoramento genético e o aumento da produção de bovinos e esta biotecnologia proporciona uma densidade numérica de prenhez prenhez por doadora de alto valor genético maior por estação do que a inseminação artificial, por exemplo.

O interesse pela área da reprodução animal se aperfeiçoou, poder aprofundar o conhecimento sobre biotécnicas e sobre a produção de embriões foi uma grande realização. Ademais, foi possível desenvolver novas habilidades e ter uma imagem de como é a vida profissional, reforçando os valores do trabalho em equipe, compromisso e responsabilidades.

Logo, o convívio com diferentes profissionais, agregou muito ao desenvolvimento pessoal, técnico e social, tornando o estágio muito proveitoso.

6. REFERÊNCIAS

- ADONA, Paulo Roberto *et al.* **Biotécnica de produção in vitro de embriões bovinos.** Londrina: Científica, 2017. 14 p.
- BORGES, E. D.; BERTELI, T. S.; REIS, T. F.; SILVA, A. S.; VIREQUE, A. A. **Microbial contamination in assisted reproductive technology: source, prevalence, and cost.** Journal Of Assisted Reproduction And Genetics, [S.L.], v. 37, n. 1, p. 53-61, 10 dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC.
- BUENO, Ataliba Perina *et al.* **Produção in vitro de embriões bovinos.** Revista Científica Eletônica de Medicina Veterinária, Garça, p. 1-7, jul. 2008. Semestral.
- ESTEVES, Sandro *et al.* **Clean Room Technology in ART Clinics: a practical guide.** Boca Raton: Crc Press, 2017.
- GONÇALVES, Paulo *et al.* **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal e à Humana.** 3. ed. São Paulo: Roca, 2021. 20 v.
- HONORATO, M.T. *et al.* **Importância da escolha de receptoras em um programa de transferência de embriões em bovinos.** PUBVET, Londrina, V. 7, N. 19, Ed. 242, Art. 1601, Outubro, 2013.
- MARIANO, Renata Sitta Gomes. **ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM RUMINANTES: revisão de literatura.** Revista Investigação Medicina Veterinária, Jaboticabal, p. 46-53, dez. 2015.
- NOGUEIRA, Érikis *et al.* **Comparação entre protocolos de sincronização de cio para receptoras de embriões bovinos.** Revista Brasileira de Saúde de Produção Animal, Salvador, v. 14, p. 558-564, set. 2013.
- PARRA, Bruno César *et al.* **ASPECTO SANITÁRIO NA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES DE BOVINOS.** Revista Científica Eletônica de Medicina Veterinária, Garça, v. 10, p. 1-7, jan. 2008. Semestral.
- PASA, Camila. **TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS.** 2012. 9 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2012.
- PICCOLOMINI, Mariana Moraes *et al.* **Alterações na morfologia e na viabilidade no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados in vitro com sêmen contaminado experimentalmente à Escherichia coli produtora da toxina Shiga stx2.** Arquivos do Instituto Biológico, [S.L.], v. 82, n. 0, p. 1-6, 3 nov. 2015. Fac UNIFESP (SciELO).
- SANGILD, P.T. *et al.* **Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro produced bovine embryos.** Biol. Reprod., v.62, p.1495-1504, 2000.
- SILVA, Ana Eliza *et al.* **Aspiração folicular em bovinos - revisão.** Revista Sinapse Múltipla, Minas Gerais, v. 10, n. 1, p. 28-30, jan. 2021. Semestral.

SOUZA, N.S. **Produção in vitro de embriões bovinos: etapas de produção e histórico no Brasil.** Ciência Veterinária UniFil, Londrina-PA, v. 1, n. 3, p. 95-108, mar. 2019.

THIBIER, Michel; PERRY, George. **IETS management of the challenges associated with embryo pathogen interaction.** Reproduction, Fertility And Development. 21 set. 2023. CSIRO Publishing.

THOMPSON, J.G. **In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement.** Anim. Reprod. Sci, v.60-61, p.263-275, 2000.

VIANA, J. H. M. et al. 2020 **Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: A new milestone has been reached: Transfers of IVP embryos were over one million worldwide.** Embryo Technology. Newsletter, v. 40, n. 4, p. 1-19, 2022.

VIANA, João Henrique Moreira. **Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo.** In: LEITE, Embrapa Gado de. Comunicado Técnico. Juiz de Fora. 2009. Cap. 59. p. 1-4.

WARD, F, *et al.* **Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete coincubation, sperm concentration and sire.** Theriogenology, v. 57, I. 8, p. 2105-2117, 2002.

CERTIFICADO



Certifico que a aluna de Medicina Veterinária, Helen Brandalise Mazzarollo participou do estágio curricular na empresa BIOTEC durante de 24 de julho de 2023 à 30 de outubro de 2023 totalizando 546 horas.

Nova Prata, 20 de novembro de 2023



Monique Mazzarollo Frata
Médica Veterinária
CRMV/RS 15797