



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA-TO
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA**



AERTON RIBEIRO GOMES

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:
BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO ANIMAL**

ARAGUAÍNA/TO

2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA-TO
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E
ZOOTECNIA**



AERTON RIBEIRO GOMES

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:
BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO ANIMAL**

Relatório de Estágio Curricular Supervisionado Obrigatório apresentado ao curso de Medicina Veterinária da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luís Ferreira

Supervisor: Dra. Margot Alves Nunes Dode

ARAGUAÍNA/TO

2014

AERTON RIBEIRO GOMES

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:
BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO ANIMAL

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jorge Luís Ferreira
(Doutor em Zootecnia)
Orientador

Prof^a Dr^a. Fabiana Cordeiro Rosa
(Doutora em Zootecnia)

Méd. Vet. Leandro Lopes Nepomuceno
(Mestrando em Produção Animal)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus, pelo dom da vida, pela perseverança, determinação e por ter me concedido saúde para chegar até aqui.

Aos meus pais, Marlene e Aerton, pelo apoio incondicional durante estes longos anos de graduação, nunca mediram esforços e fizeram tudo que estava ao alcance para que eu realizasse o meu sonho, ser Médico Veterinário. A minhas irmãs, Érica e Andréia, pelo exemplo de autoconfiança e determinação.

Ao meu orientador acadêmico, Prof. Dr. Jorge Luís Ferreira, por seu apoio e orientação. À minha supervisora de estágio, Dra. Margot Dode por ter me proporcionado a oportunidade de estágio nesta renomada instituição de pesquisa.

Ao Dr. Ivo Pivato, pelo apoio e disposição demonstrados sempre que eu apresentava dúvidas. Pessoa que demonstra grande satisfação e prazer de transmitir seus conhecimentos.

Ao meu grande amigo, Lazaro Moreira, pelos momentos de alegria, pelas risadas, pelos desabafos nas horas estressantes vivenciadas durante a graduação.

Aos amigos, Jeferson Gaúcho, Cristiane Duarte, Samuel Mendes, Geraldo, Givanildo, Diego Carreirinha, Djalma Bahia, Thiago Carcaça, Alex Machado, João Butija, com quais, durante esses anos, passei mais tempo do que com minha família, obrigada pela companhia e amizade.

Aos amigos estagiários, mestrandos, doutorandos da Embrapa Cenargen e Fazenda Sucupira, Aline, Chico, Eleonora, Felipe, Marianna, Mateus, Netto, Rafaelli, Renato, obrigado pela paciência e disponibilidade para responder todos meus questionamentos, por todos os ensinamentos e pelos bons momentos vivenciados na Fazenda Sucupira.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela oportunidade de estágio.

À Universidade Federal do Tocantins e todos seus professores e funcionários.

RESUMO

O estágio curricular supervisionado foi realizado na Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia. No Laboratório de Reprodução Animal (LRA) II - Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem e finalizado no Laboratório de Reprodução Animal (LRA) I - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, os dois estão situados no município de Brasília – DF, transcorrendo de abril a julho de 2014, sob a supervisão da Dr^a. Margot Alves Nunes Dode. O estágio teve ênfase na área de Biotecnologias da Reprodução Animal, possibilitando a realização e o acompanhamento de diversas técnicas da reprodução assistida em bovinos, como aspiração folicular de ovários, PIV de embriões bovinos, avaliação dos embriões cultivados *in vitro*, dissecação de ovários para obtenção de folículos ovarianos, acompanhamento de clonagem por transferência nuclear de célula somática, transferência de embriões, coleta de embriões, diagnóstico de gestação com uso da ultrassonografia; coleta, avaliação e congelamento de sêmem bovino, participação no Journal Club. Além disso, houve a oportunidade de acompanhar toda a rotina de manejo sanitário, nutricional e reprodutivo dos animais da Fazenda Sucupira.

Palavras chaves: aspiração folicular, bovino, embriões

ABSTRACT

The supervised curricular training was conducted at Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. Starting at the Laboratory of Animal Reproduction (LRA) II - Field Experimental Sucupira, Roberto de Assis Well and finished at the Laboratory of Animal Reproduction (LRA) I - Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, both are situated in the city of Brasilia - DF, spending from April to July 2014, under the supervision of Dr. Margot Alves Nunes Dode. The stage had an emphasis in the area of Biotechnology of Animal Reproduction, enabling the execution and monitoring of various techniques of assisted reproduction in cattle, as follicular aspiration of ovaries, IVP bovine embryos, evaluation of embryos cultured in vitro dissection of ovaries to obtain ovarian follicles, monitoring cloning by somatic cell nuclear transfer, embryo transfer, embryo recovery, pregnancy diagnosis using ultrasonography; collection, evaluation and freezing of bovine semen, participation in Journal Club. In addition, there was the opportunity to follow the whole routine sanitary, nutritional and reproductive management of farm animals Sucupira.

Keywords: follicular aspiration, bovine embryos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
®	Produto registrado
BE	Blastocisto Eclodido
BI	Blastocisto Inicial
BL	Blastocisto
BX	Blastocisto Expandido
CAP	Meio de capacitação
Cenargen	Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia.
CES	Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem.
CIV	Cultivo in vitro
CO²	Dióxido de carbono
CT	Centro de Treinamento
D2	Dia dois do Tratamento
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMVZ	Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia
FD	Folículo Dominante
FIV	Fecundação in vitro
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
ha	Hectares
Km	Quilômetro
LRA I	Laboratório de Reprodução Animal I
µl	Microlitro
MIV	Maturação in vitro
mL	Mililitro
mM	Micromolar
N	Nitrogênio
O	Oxigênio
PBI	Prédio da Biotecnologia
PBS	Tampão Fosfato-salino ou Phosphate Buffered Saline
PIV	Produção in vitro
PqEB	Parque Estação Biológica
prof.	Professor
rpm	Rotações por minuto
SBTE	Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões
SOF	Fluido Sintético de Oviduto
Talp	Tyrode's Albumin-Lactate-Pyruvate
SPTZ	Espermatozoide
TCM	Meio de Cultura de Tecidos ou Tissue Culture Medium
TE	Transferência de Embriões

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Vista da entrada principal da Empresa Recursos Genético e Biotecnologia.	10
Figura 2- Imagem de Satélite do Campo Experimental Sucupira.....	12
Figura 3- Banho-maria	14
Figura 4-Classificação de Oócitos	15
Figura 5- Avaliação embrionária.	17
Figura 6- Ilustração da coleta de embriões	17
Figura 7- Ilustração da coleta de Embriões.....	18
Figura 8- Aparelho de Ultra-Som	19
Figura 9- Banco de Germoplasma Animal.....	21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	10
3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	13
3.1. ASPIRAÇÕES DE OVÓCITOS.....	13
3.1.1 Rastreamento e Seleção dos Ovócitos.	14
3.2 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	15
3.2.1 Maturação <i>in vitro</i> de Embriões (MIV).....	15
3.2.2 Fecundação <i>In Vitro</i> (FIV).....	16
3.2.2.1 Capacitação dos espermatozoides para a FIV.....	16
3.2.3 Cultivo <i>In Vitro</i> (CIV).....	16
3.3. COLETA DE EMBRIÕES EM BOVINOS	17
3.4. ULTRASSONOGRAFIA.....	19
3.5. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES.....	20
3.6. EXAME ANDROLÓGICO	20
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	22
5. REFERÊNCIAS E CONSULTAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1. INTRODUÇÃO

O estágio curricular supervisionado obrigatório transcorreu no período de 28 de abril a 23 de julho do corrente ano, perfazendo uma carga horária total de 500 horas. A escolha da área de reprodução animal e principalmente a biotecnologia da reprodução teve como objetivo aprofundar os conhecimentos adquiridos durante a graduação e vivenciar o dia-a-dia dessa área de atuação do médico veterinário.

No Campo Experimental Sucupira desenvolveram-se atividades referentes à organização e procedimentos em laboratório e técnicas de biossegurança. Adicionalmente foram desenvolvidas atividades de rotina e manejo com animais da fazenda, e atividades de dissecação de ovários, fecundação, maturação e cultivo in vitro de embriões, transferência de embriões, entre outras relacionadas. O presente trabalho tem por objetivo relatar as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular supervisionado obrigatório, bem como apresentar e discutir algumas das técnicas de reprodução assistida desenvolvidas durante o estágio.

2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

A Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), criada em 26 de Abril de 1973, possui sede em Brasília e em mais 47 unidades de pesquisa e serviços espalhadas em todas as regiões do Brasil. A unidade localizada em Brasília (Figura 1), a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) tem como missão viabilizar o desenvolvimento e inovação na área de recursos genéticos voltados para a sustentabilidade da agropecuária brasileira. A atuação da Embrapa é nacional e internacional, sendo então referência por suas patentes, pesquisas e outros serviços (EMBRAPA, 2011).



Figura 1- Vista da entrada principal da Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia.

Nos anos 70, a Food and Agriculture Organization (FAO) das Nações Unidas, estimulou o estabelecimento de uma rede mundial de Centros para Conservação de Recursos Genéticos, em regiões consideradas de alta variabilidade genética. Neste contexto, em 22 de Novembro de 1974, a Embrapa criou o Centro

Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN), que mais recentemente adotou a assinatura Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia está localizada no Parque Estação Biológica, ao final da Asa Norte, próximo ao lago Paranoá. A unidade possui atualmente, uma área total construída superior a 30.000m², onde se destacam:

- Prédio da Administração;
- Auditório Assis Roberto de Bem;
- Biblioteca Especializada;
- Conjunto de prédios de apoio: guaritas de acesso com segurança 24h, oficinas, garagem para veículos de frota, galpões, almoxarifado, depósitos, abrigos para grupos geradores de energia, incinerador e depósito de Material Radioativo;
- Instalações e recursos de apoio à pesquisa: 28 Casas de vegetação, 14 Telados, 1 Estufa;
- Instalações e prédios de áreas técnicas e de pesquisa:
 - Prédio da Biotecnologia – PBI
 - Prédio do Controle Biológico I – PCB I
 - Prédio do Controle Biológico II – PCB II
 - Prédio da Conservação de Germoplasma – PCG
 - Prédio da Coleta e Caracterização de Germoplasma
 - Prédio da Quarentena de Germoplasma
 - Prédio da Informática
 - Prédio da Botânica e Ecologia – (PBE)
 - Fazenda Sucupira (Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem)

O Campo Experimental Sucupira Assis Roberto de Bem (Figura 2) está situado a 35 km do Plano Piloto, em Brasília, e possui uma área total de 1.800 ha e área construída de mais de 2.000m². Além do Laboratório de Reprodução Animal, o Campo Experimental Sucupira também abriga raças de animais domésticos ameaçadas de extinção (bovinos, suínos, ovinos, equinos, caprinos e asininos) do Banco Brasileiro de Germoplasma Animal e alguns bancos de espécies florestais nativas exóticas.

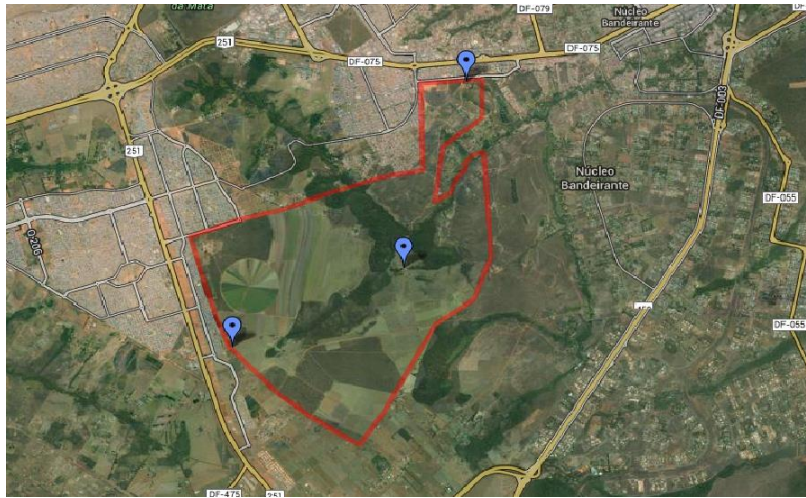


Figura 2- Imagem de Satélite do Campo Experimental Sucupira Assis Roberto De Bem. Fonte: <https://maps.google.com.br/>

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Todos os procedimentos e rotinas laboratoriais obedeceram aos padrões e normas técnicas dos Laboratórios da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

3.1. ASPIRAÇÕES DE OVÓCITOS

Os ovários são obtidos de frigoríficos da região do entorno de Brasília-DF, de vacas sem raça definida. Após a coleta são colocados em recipiente de vidro estéril, contendo solução salina (0,9%) suplementada com antibióticos, aquecida a 32-35 °C. Os recipientes de vidro eram acondicionados em caixas térmicas, para que os ovários não tivessem uma variação de temperatura brusca o que acabaria inviabilizando os ovócitos. O tempo da coleta até a aspiração era de 6 a 8h, após se iniciarem os trabalhos na linha de abate.

Depois de chegar ao laboratório, os ovários são colocados em banho-maria (figura 3), para manter a temperatura, e então aspirados individualmente através de uma agulha 40x12 mm acoplada a uma seringa. O líquido folicular proveniente da aspiração é colocado em tubos Falcon, deixados em posição vertical no banho-maria. O banho-maria deve ser ligado pelo menos 2 horas antes do início da aspiração. Após completar os tubos com o líquido aspirado, o sobrenadante é retirado com o auxílio de uma pipeta.



Figura 3- Banho-maria

3.1.1. Rastreamento e Seleção dos Ovócitos

O conteúdo aspirado é então colocado em placas de Petri (grande), contendo líquido folicular oriundo da aspiração, para que os ovócitos pudessem ser rastreados com auxílio do microscópio estereoscópio. Os ovócitos rastreados são colocados em outra placa de Petri, menor que à primeira, contendo 2-3 mL de meio PBS (Phosphate buffered saline).

Depois de rastreados, esses ovócitos são selecionados e separados em grupos de acordo com a classificação. A classificação ocorre de acordo com a quantidade de células do *cumulus* e a qualidade morfológica intracelular. O critério de seleção usado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia é o proposto por Leibfried et al. (1979), adaptado por Gonçalves et al. (2002):

a) Grau I: Cumulus compacto, contendo mais de três camadas de células. Citoplasma com granulações finas e homogêneas, de coloração marrom, preenchendo o interior da zona pelúcida (Figura 4 A).

b) Grau II: Cumulus compacto parcialmente presente ou com menos de três camadas celulares rodeando completamente o ovócito. Citoplasma com granulações distribuídas heterogeneamente (figura 4 B).

c) Grau III: Cumulus expandido. Citoplasma contraído, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida (figura 4 C).

d) Grau IV: Ovócito sem cumulus ou desnudo (Figura 4 D).

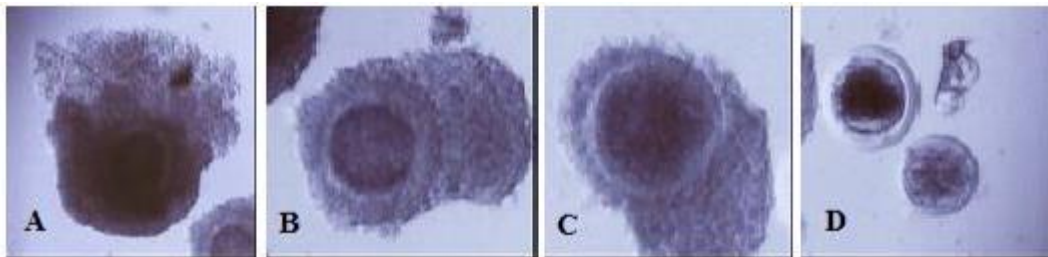


Figura 4-Classificação de Oócitos
Fonte: Embrapa CENARGEN

3.2 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

O processo de produção *in vitro* de embriões se divide em três principais etapas: maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV).

3.2.1 Maturação *in vitro* de Embriões (MIV)

Os ovócitos utilizados são os de grau I e II e colocados em gotas de 200µl de meio de maturação para lavagem. Após a lavagem, são transferidos aproximadamente 25 a 30 ovócitos para cada gota de meio MIV. Essas gotas são cobertas com óleo mineral que impede a evaporação do meio. Os ovócitos permanecem por 20 a 22 horas no meio de maturação em estufa (a 39 °C, com 5 % de CO²).

3.2.2 Fecundação *In Vitro* (FIV)

3.2.2.1 Preparação dos espermatozoides para a FIV

Retira-se a palheta de dentro do botijão, contendo nitrogênio a -196°C , e colocou-se imediatamente em um recipiente contendo água a aproximadamente 37°C , deixando por cerca de 30 segundos. Feito isso, cortou-se a palheta para despejar o conteúdo em microtubos (eppendorf). Colocou-se o sêmen sobre a coluna de Percoll e levou à centrifuga (9000rpm/5min). Retirou-se o “pellet” e o adicionou em 1mL de meio CAP (meio para capacitação), pois como o Percoll é uma substância tóxica é necessário utilizar um meio básico para neutralizar a ação tóxica do Percoll. Depois de colocado em meio CAP, centrifugou-se novamente a 9000rpm/5min, retirando posteriormente o sobrenadante e acrescentando em torno de 100 μl de FEC (meio de fecundação) final. Avaliou-se a motilidade e o vigor do sêmen, para depois realizar a contagem de espermatozoides na câmara de Neubauer e calcular a concentração espermática e a dose inseminante.

Depois de capacitados, os espermatozoides são microinjetados dentro dos oócitos pré-selecionados e levados à estufa novamente, para ficarem incubados em meio de fecundação por 12 a 18 horas.

3.2.3 Cultivo *In Vitro* (CIV)

Após as 18 horas de co-cultivo, os prováveis zigotos são retirados do meio FIV, levemente pipetados e lavados em 2 a 3 gotas do meio SOF (synthetic oviduct fluid), para remover os espermatozoides e transferir os zigotos para a gota de cultivo embrionário. No D2, 48 horas após a inseminação da FIV, os zigotos foram avaliados quanto à clivagem e calculou-se a taxa de blastocisto em D6, D7 e D8 (figura 5). A partir de D7-D8 os embriões formados já estão aptos para serem inovulados em receptoras, ou até mesmo criopreservados.



Figura 5- Avaliação embrionária.
Fonte: Embrapa CENARGEN

3.3. COLETA DE EMBRIÕES EM BOVINOS

Durante o estágio foi possível acompanhar e executar com bastante frequência a coleta de embriões através da “lavagem do útero” por um sistema de sonda (Figura 6). Os embriões são produzidos no LRA II. Logo após passar o tempo de maturação embrionária eles são transferidos para as vacas receptoras, a partir daí conta-se 7 dias e realiza-se a coleta dos embriões. O líquido usado para realizar a lavagem é solução de PBS aquecido a 37 °C.



Figura 6- Ilustração da coleta de embriões

Primeiramente o animal é encaminhado até o tronco e contido adequadamente. Em seguida é feita anestesia epidural, com 3,5mL de Lidocaína. Após o bloqueio anestésico é feita higienização com água e sabão, e secagem na região da vulva. A sonda de Foley. é introduzido no útero por via transcervical com o auxílio de um mandril de aço. Esta é posicionada no corpo do útero, sendo fixada inflando o balão com aproximadamente 10 ml de PBS (Figura 7).

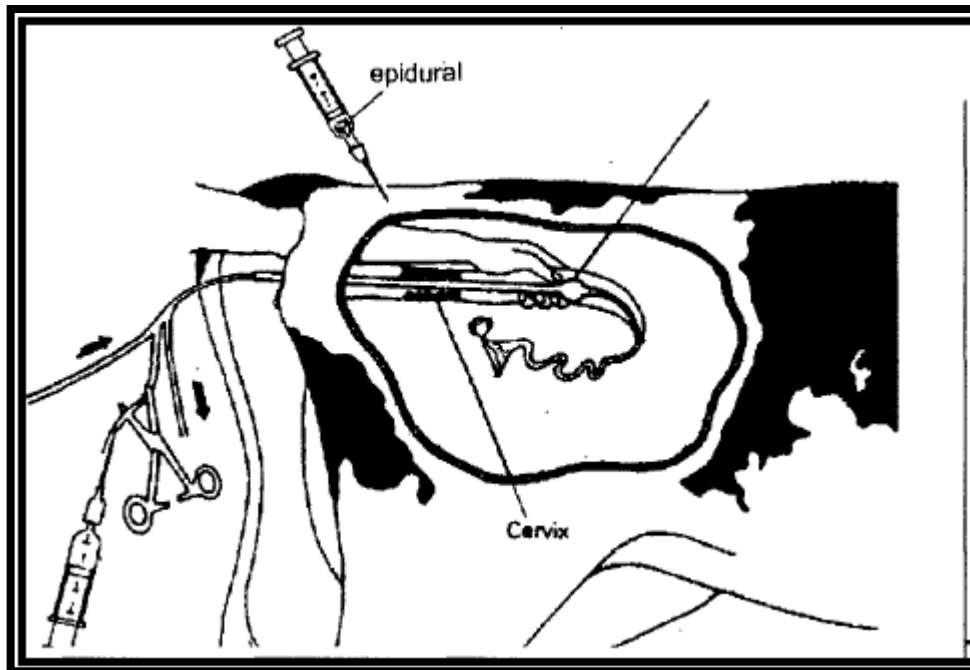


Figura 7- Ilustração da coleta de Embriões

Posteriormente conecta-se um equipo em Y, sendo uma das extremidades conectada a bolsa contendo PBS e a outra direcionada para uma proveta. Por gravidade, 1 a 2L da solução de PBS com 5% SFB, desce ao útero lavando simultaneamente os dois cornos uterinos. Esse volume era dividido em múltiplas lavagens e a massagem uterina era fundamental para completa drenagem do líquido.

Ao final, a proveta com o líquido proveniente da lavagem era enviada ao laboratório onde passava por filtragem e o conteúdo transferido para uma placa de petri, para a realização do rastreamento dos embriões com microscópio estereoscópio.

3.4. ULTRASSONOGRAFIA

O acompanhamento do exame de ultrassonografia é realizado de forma rotineira no Campo Experimental Sucupira Assis Roberto De Bem. Este uso frequente se justifica devido as suas inúmeras aplicações no campo experimental. Com isso o estagiário teve a oportunidade de realizar e acompanhar as seguintes atividades: avaliação de vacas receptoras para observação do estado reprodutivo e com isso, verificar se as mesmas estavam aptas a receberem os embriões; diagnóstico de gestação precoce e exames ginecológicos, cuja ultrassonografia foi utilizada para a observação da dinâmica folicular, triagem de animais para protocolos hormonais ou sincronização de estro, diagnóstico de várias patologias e avaliação do potencial para produção de embriões (TE ou PIV).

Utilizou-se também a técnica de Ultrassonografia com uso do modo Doppler (figura 8) para observar a irrigação dos corpos lúteos. Esta avaliação foi realizada para avaliar a qualidade do corpo lúteo. Além de avaliar a qualidade ela funciona como um método auxiliar para a confirmação da existência do CL. Após a identificação e análise da qualidade do CL eram efetuadas as transferências de embriões caso se tratasse de rebanho de receptoras de embriões e receptoras de clones.



Figura 8- Aparelho de Ultra-Som

3.5. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

Todas as transferências de embriões acompanhadas durante o período foram realizadas no Campo Experimental Sucupira Assis Roberto De Bem (LRA) II. Anexo ao LRA II existe um centro de manejo, neste local os animais são contidos para que possam ser realizadas as transferências de embriões e outras biotécnicas. O centro de manejo possui comunicação com o LRA II através da janela de acesso, por essa comunicação que se passava os materiais utilizados nesta biotécnica. No laboratório é realizada a seleção e envase dos embriões, e posteriormente são encaminhados para a equipe que fica no centro de manejo.

Realizava-se a contenção física do animal, que era feita com o auxílio do tronco de contenção; posteriormente era realizada a contenção química com aproximadamente 3,5 mL de lidocaína em bloqueio epidural. Assim que a cauda do animal apresentava flacidez, era iniciada a higienização da vulva. Para transferir um embrião, utiliza-se um inovulador, devidamente montado revestido por uma bainha acrílica descartável, com o embrião em seu interior.

O inovulador com o embrião protegido pela camisa sanitária era introduzido na vulva até o fundo de saco vaginal. Depois era introduzido o braço esquerdo pelo reto, e com a mão direita era realizada a manipulação do inovulador até se constatar que estava na entrada da cérvix, onde era rompida a camisa sanitária, passagem da cérvix e migração para o corno uterino *ipsi* lateral ao CL. A deposição do embrião era o mais próximo possível da junção útero tubárica.

3.6. EXAME ANDROLÓGICO

A realização do exame andrológico em touros é muito importante para a avaliação da capacidade reprodutiva. Este exame fundamenta-se na avaliação de todos os fatores que contribuem para a função reprodutiva de um reprodutor e eram realizados obedecendo as seguintes etapas: anamnese, o exame clínico geral, e posteriormente, exame do sistema reprodutor com a inspeção e a palpação dos órgãos genitais externos. Posteriormente era realizada a estimulação das glândulas sexuais acessórias dos touros por meio de eletroejaculador para a obtenção do ejaculado.

Os exames andrológicos realizados durante o estágio foram quase na totalidade em animais do núcleo de conservação de espécies nativas. Quando o material coletado atendia as exigências mínimas para o congelamento preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1988) era criopreservado e armazenado no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (figura 9). As exigências são: 70% de motilidade e 3 de vigor.



Figura 9- Banco de Germoplasma Animal

Portanto, o sêmen era avaliado imediatamente após cada coleta, essa avaliação era realizada no laboratório, que é anexo ao centro de manejo e possui comunicação direta com este. A análise se baseava na visualização das características macroscópicas (volume, cor, aspecto) e microscópicas (turbilhão, motilidade, vigor e concentração). Quando havia o cumprimento dos requisitos mínimos eram criopreservado (armazenado) em botijão de nitrogênio líquido, a uma temperatura de -196°C , o que preserva a sua qualidade.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o período de estágio na Emprapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, tive a oportunidade de acompanhar a rotina experimental e conhecer muitas biotecnologias que pretendo aplicar na minha vida profissional. Por isso cheguei a conclusão de que todos meus objetivos e perspectivas em relação ao estágio foram plenamente atingidos, pois consegui aprimorar meus conhecimentos adquiridos durante a graduação, que contribuiu para a minha formação profissional. Após este período de aprendizado, me sinto mais preparado para enfrentar o mercado de trabalho e satisfazer as necessidades constantes dessa área de atuação do Médico Veterinário.

5. REFERÊNCIAS E CONSULTAS BIBLIOGRÁFICAS

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Minas Gerais: CBRA, 1998.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGEUIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda. p.195-226, 2002.

HAFEZ, E.S.E. e HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7^a.ed. Barueri, SP: Manole, 2004.
LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **Journal of Animal Science**, v.48, p. 76-86, 1979.

MARTINS, C. F. **O impacto da transferência de embriões (TE) e da fecundação in vitro (FIV) na produção de bovinos no Brasil**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2010. Disponível em:
<<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/243/>>. Acesso em: 15 agosto. 2014.

PALMA, G. Producción in vitro de embriones. In: PALMA, G. **Biología de la Reproducción**, Argentina, 1Ed. INTA Editora, 2001. 701p.