

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA  
INSTITUTO FEDERAL GOIANO CAMPUS URUTAÍ  
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO**

Bioteχνologias em Reprodução Animal

Aluno(a): Luís Gustavo Lopes Silva  
Orientador(a): Wesley José de Souza

URUTAÍ  
2019

Luís Gustavo Lopes Silva

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO**

Biotecnologias em Reprodução Animal

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí como parte dos requisitos para conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária

ORIENTADOR: Wesley José de Souza

SUPERVISOR: Maurício A. S. Peixer

URUTAÍ  
2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO**

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

**Identificação da Produção Técnico-Científica**

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese  | <input type="checkbox"/> Artigo Científico              |
| <input type="checkbox"/> Dissertação                                 | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro              |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização                 | <input type="checkbox"/> Livro                          |
| <input type="checkbox"/> TCC – Graduação                             | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ |   |

Nome Completo do Autor: Luís Gustavo Lopes Silva

Matrícula: 2015101201240043

Título do Trabalho: Relatório de estágio curricular supervisionado /Redução de injúrias ovarianas em doadoras de embriões bovinos usando tratamento intra-ovariano de células-tronco mesenquimais.

**Restrições de Acesso ao Documento**

Documento confidencial:  Não  Sim, justifique: \_\_\_\_\_

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: \_\_/\_\_/\_\_

O documento está sujeito a registro de patente?  Sim  Não

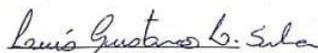
O documento pode vir a ser publicado como livro?  Sim  Não

**DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA**

O/A referido/a autor/a declara que:

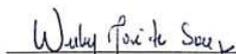
- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Urutaí, 08/01/2020



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)

**ATA DE APROVAÇÃO DE TRABALHO DE CURSO**

As 10.25 horas do dia 11 de dezembro de 2019, reuniu-se na sala nº \_\_\_\_\_ do Prédio Auditorio Prédio Caçaria do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Urutaí, a Banca Examinadora do Trabalho de Curso intitulado "Redução de infusões ovarianas em doadoras de embriões bovinos usando tratamento intra-ovariano de células-tronco mesenquimais"

composta pelos professores Adriana de Silva Santos, Bruno Morine, Naves Silva e Wesley José de Souza

\_\_\_\_\_, para a sessão de defesa pública do citado trabalho, requisito parcial para a obtenção do Grau de Bacharelado em Medicina Veterinária. Para fins de comprovação, o aluno (a) Luiz Gustavo Lopes Silva foi considerado Aprovado (APROVADO ou NÃO APROVADO), por unanimidade, pelos membros da Banca Examinadora.

Assinatura dos membros da Banca Examinadora	Situação (Aprovado ou Não Aprovado)
1. <u>Wesley José de Souza</u>	<u>APROVADO</u>
2. <u>Adriana de Silva Santos</u>	<u>APROVADO</u>
3. <u>Bruno M. Naves Silva</u>	<u>APROVADO</u>

Urutaí-GO, 11 de dezembro de 2019.

Observações:

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

*Dedico esse trabalho a João  
Caetano Lopes e Anita Alves  
Lopes, os mesmos que  
despertaram em mim o amor e  
dedicação pelo AGRO.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, que durante minha jornada se mostrou presente e me fez acreditar que era possível realizar meus sonhos.

Aos Meus pais por proporcionarem a oportunidade de estudar, ofertando sempre todo apoio e incentivo.

Ao Instituto Federal Goiano por me fornecer uma educação de excelência desde o ensino médio técnico e a todos os professores e servidores do núcleo de medicina veterinária que colaboraram com meu aprendizado durante esses anos de graduação.

Agradeço aos meus amigos que por este período se fizeram minha família apoiando nas minhas decisões e crescimento pessoal, de uma forma especial a Yasmin Dorneles Carrilha pelo companheirismo e cumplicidade.

A todos os colaboradores da empresa Bio – Biotecnologia Reprodução Animal que ajudaram na reta final do curso, durante o estágio obrigatório, acrescentando conhecimentos de grande importância.

Por último, mas não menos importante, agradeço a todos do Programa Cão-Guia que me acolheram e tanto colaboraram para meu crescimento profissional.

*“Seja a mudança que você quer ver no mundo”*

**Mahatma Gandhi**

**SUMÁRIO**

<b>CAPÍTULO 1 (RELATÓRIO DE ESTÁGIO)</b> .....	1
<b>1 IDENTIFICAÇÃO</b> .....	1
<b>1.1 Nome do aluno..... Matrícula</b> .....	1
<b>1.2 Nome do supervisor:</b> .....	1
<b>1.3 Nome do orientador:</b> .....	1
<b>2 LOCAL DE ESTÁGIO</b> .....	1
<b>2.1 Nome do local estágio</b> .....	1
<b>2.2 Localização</b> .....	1
<b>2.3 Justificava de escolha do campo de estágio.</b> .....	1
<b>3 DESCRIÇÃO DO LOCAL E DA ROTINA DE ESTÁGIO</b> .....	1
<b>3.1 Descrição do local de estágio</b> .....	1
<b>3.2 Descrição da rotina de estágio</b> .....	3
<b>3.3 Resumo quantificado das atividades</b> .....	5
<b>CAPÍTULO 2 (RELATO DE CASO)</b> .....	8
<b>ANEXO (NORMAS DO PERIÓDICO)</b> .....	18

## LISTA DE FIGURAS

- Figuras nº 1-** Sede Bio – Biotecnologia em Reprodução Animal. 1A) Faixada da empresa. 1B) Recepção aos clientes. Fonte: arquivo pessoal.....1
- Figura nº 2-** Laboratório de análise de sêmen. Fonte: Arquivo pessoal.....2
- Figuras nº 3-** Fazendas atendidas durante o estágio. 3A) Vacas de fazenda leiteira no município de Unaí – MG. 3B) Creep feeding em fazenda de produção de tourinhos nelore. Fonte: Arquivo pessoal.....3
- Figuras nº 4-** Rotina nas fazendas. 4A) Início do protocolo de IATF em novilhas nelores super precoce 10-11 meses. 4B) Montagem de inovulador com embriões à fresco para aplicação da técnica de TE. Fonte: Arquivo pessoal.....3
- Figuras nº 5-** Rotina nas fazendas. 5A) Bezerro em apresentação das patas dianteiras para o parto. 5B) Coleta do ejaculado de touro. Fonte: Arquivo pessoal.....4

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**CASA:** *Computer Assisted Spem Analysis.*

**CTM:** Células-tronco mesenquimais.

**DF:** Distrito Federal.

**DG:** Diagnóstico de gestação.

**FIV:** Fertilização *in vitro*.

**IATF:** Inseminação artificial em tempo fixo.

**OPU:** *ovum pick-up.*

**PIVE:** Produção *in vitro* de embriões.

**PO:** Puro de origem.

**TE:** Transferência de embriões.

**TETF:** Transferência de embriões em tempo fixo.

**TTR:** Teste de resistência térmica.

## CAPÍTULO 1 (RELATÓRIO DE ESTÁGIO)

### 1 IDENTIFICAÇÃO

**1.1 Nome do aluno:** Luís Gustavo Lopes Silva **Matrícula:** 2015101201240043

**1.2 Nome do supervisor:** Maurício A. S. Peixer

**1.3 Nome do orientador:** Wesley José de Souza

### 2 LOCAL DE ESTÁGIO

**2.1 Nome do local estágio:** BIO – Biotecnologia Reprodução Animal

**2.2 Localização:** SMPW Qd. 05 conj. 05 lote 01 casa C s/n cj 5 lt 1 Md 1 - Núcleo Bandeirante, Brasília - DF, 71735-500

**2.3 Justificava de escolha do campo de estágio:** Por ser uma área em ascensão e de grande importância na produção animal, podendo assim agregar valores e conhecimentos práticos na conclusão da graduação, assim estando mais preparado para o mercado de trabalho.

### 3 DESCRIÇÃO DO LOCAL E DA ROTINA DE ESTÁGIO

#### 3.1 Descrição do local de estágio

Atualmente, a BIO – Biotecnologia Animal oferece uma grande variedade de soluções biotecnológicas, para cumprir diferentes programas de desenvolvimento animal da medicina genética e veterinária, tais como: transferência de embriões (TE), fertilização *in vitro* (FIV), criopreservação de embriões, andrologia, ultrassom de análise reprodutiva e terapia com células-tronco.

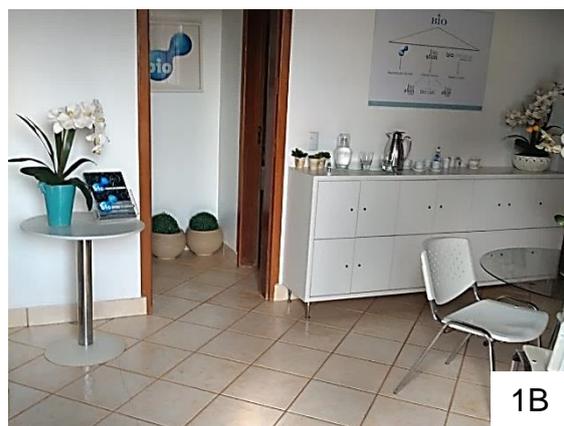
Estruturalmente observa-se uma sede (Figura 1A), composta por sala de recepção aos clientes, escritório, centro administrativo, laboratório de análise de sêmen, sala de campo, laboratório de fertilização *in vitro*, sala de esterilização e lavanderia.

A sala de recepção (Figura 1B) é onde os clientes podem esperar lendo informações da área e sobre os trabalhos executados pela empresa, no local existe uma mesa para reuniões. O escritório e centro administrativo, esta parte da empresa é responsável pelas compras e vendas, organização da agenda de trabalho, atendimento ao cliente e análise financeira. A sala de campo é o local de armazenamento de todo o material usado a campo como: caixa cirúrgica, ultrassons, aplicadores. O laboratório de fertilização *in vitro*, onde é realizado a confecção de meios para coleta, transporte e maturação dos ovócitos e embriões, o local também é destinado a fertilização *in vitro*. A sala de esterilização possui estufas de raio ultravioleta, autoclave e tanques de desinfecção para limpeza e esterilização do material usado na FIV, aspiração

folicular e no laboratório de sêmen. E a lavanderia é destinada a lavar os uniformes e panos usados no campo.



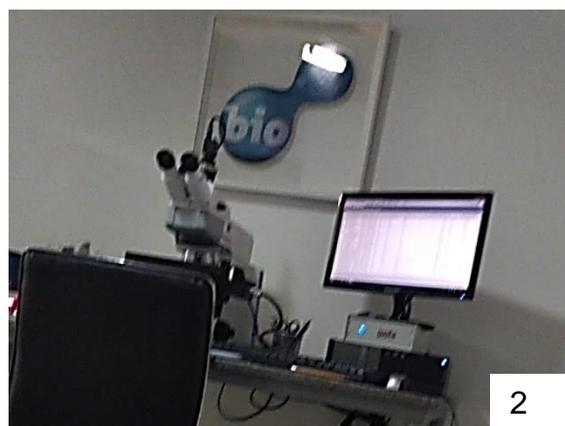
1A



1B

**Figuras:** Sede Bio – Biotecnologia em Reprodução Animal. **1A** Faixada da empresa. **1B** Recepção aos clientes.

O Laboratório de análise de sêmen (figura 2) possui microscópios e o sistema CASA (Sperm Vision©) para avaliação de sêmen congelado, no mesmo também são armazenados os botijões de nitrogênio para sêmen e embriões congelados.



2

**Figura:** Laboratório de análise de sêmen. **2** Microscópio e computador com o programa Sperm Vision© de análise de sêmen. Fonte: Arquivo pessoal.

Durante o estágio tive a oportunidade de acompanhar atividades em quase todos setores da empresa, porém a maioria das atividades foram à campo atendendo fazendas de produção de bovinos de corte e leite e equídeos.



3A

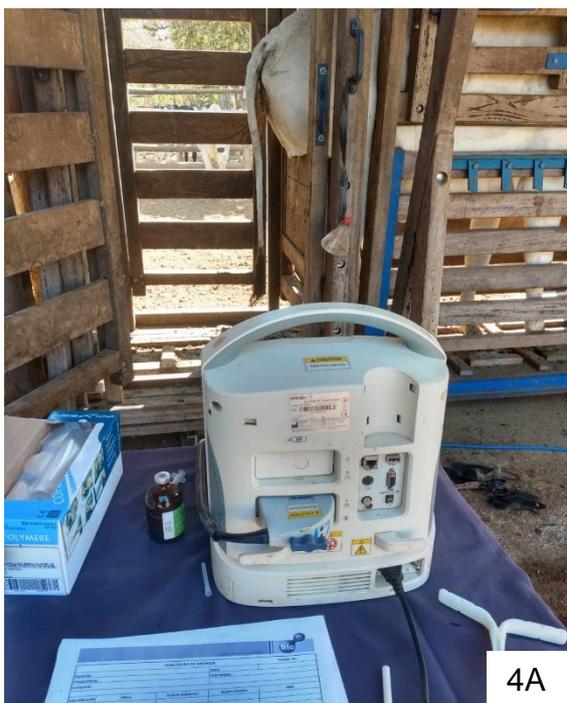


3B

**Figuras:** Fazendas atendidas durante o estágio. **3A** Vacas de fazenda leiteira no município de Unaí – MG. **3B** Creep feeding em fazenda de produção de tourinhos nelore. Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.2 Descrição da rotina de estágio

Acompanhamento e realização de rotina de campo abrangendo principalmente a bovinocultura com atividades relacionadas a inseminação artificial em tempo fixo (figura 4A), transferências de embriões (figura 4B), exames ginecológicos, tratamento de afecções de cunho reprodutivo, diagnóstico de gestação, sexagem fetal, acompanhamento de partos (figura 5A) e exames andrológicos (figura 5B).



4A



4B

**Figuras:** Rotina nas fazendas. **4A** Início do protocolo de IATF em novilhas nelores super precoce 10-11 meses. **4B** Montagem de inovidador com embriões a fresco para aplicação da técnica de TE. Fonte: Arquivo pessoal.



**Figuras:** Rotina nas fazendas. **5A** Bezerro em apresentação das patas dianteiras para o parto. **5B** Coleta do ejaculado de touro para análise. Fonte: Arquivo pessoal.

Considera-se diagnóstico de gestação os animais com registro de inseminação ou transferência de embriões com 30 dias. A sexagem fetal é realizada nos animais com gestação de 58 a 62 dias, também pode ser chamada de confirmação de gestação.

A avaliação ginecológica foi realizada em animais utilizados para reprodução avaliando o ciclo reprodutivo e os órgãos deste sistema. Os animais eram doadoras, receptoras ou animais de campo que não haviam registros reprodutivos.

O Acompanhamento de parto foi realizado em animais submetidos ao protocolo de indução de parto, assim podendo intervir caso necessário.

As TE foram realizadas utilizando embriões a fresco ou congelados produzidos através da técnica de FIV na própria empresa. Os animais submetidos a IATF foram protocolados para sincronização de ovulação e posteriormente inseminados. A IA foi realizada nos animais observados cio natural.

Os exames andrológicos foram realizados em touro P.O. para venda ou para pista de julgamento.

Avaliação de sêmen congelado, resfriado ou a fresco pelo sistema CASA (Sperm Vision®), realizando análise ao descongelamento e depois o teste de resistência térmica (TTR), realização da análise patológica do sêmen com contagem de defeitos maiores e menores.

Tabulação dos dados e posteriormente lançamento no sistema Andrologia Animal que permite ao cliente ter o acesso ao laudo do exame.

Auxílio na desinfecção e esterilização do material usado no campo e nos laboratórios de FIV e análise de sêmen.

### 3.3 Resumo quantificado das atividades

Nos quadros abaixo é possível observar quantitativamente as atividades desenvolvidas durante o estágio.

No Quadro 1 pode ser observado as atividades realizadas a campo quantificando os animais em relação ao procedimento realizado.

**Quadro 1-** Atividades desenvolvidas a campo durante o estágio obrigatório na empresa Bio de agosto a novembro de 2019 – Biotecnologia em Reprodução Animal.

Atividade desenvolvida	Quantidade de animais	%
<b>Diagnóstico de gestação</b>	297	16
<b>Sexagem Fetal</b>	47	2,5
<b>Avaliação ginecológica</b>	618	33
<b>Acompanhamento de partos</b>	11	0,5
<b>Aspiração folicular</b>	136	7,5
<b>Transferência de embriões</b>	334	18
<b>IATF</b>	387	21
<b>Exame Andrológico</b>	10	0,5
<b>IA</b>	20	1
<b>TOTAL</b>	1860	100

A campo também foi realizado o diagnóstico de gestação de 10 éguas.

Nas fazendas atendidas foram realizadas as atividades do quadro acima, algumas recebendo até mais de uma visita por semana dependendo das

atividades a ser executadas. No Quadro 2 podemos ver as fazendas atendidas relacionando com as atividades exercidas pela fazenda, o município de localização da mesma e a quantidade de visitas realizadas durante o estágio.

**Quadro 2-** Fazendas atendidas durante o estágio obrigatório na empresa Bio – Biotecnologia em Reprodução Animal.

Fazendas atendidas	Atividade praticada pela fazenda	Município	Quantidade de visitas
<b>Água Doce</b>	Confinamento, tourinhos e animais de pista.	Campo Alegre de Goiás – GO	12
<b>Sta. Luzia</b>	Produção de leite.	Unaí – MG	8
<b>Fênix</b>	Animais P.O. para pista e prova de desempenho.	Unaí – MG	9
<b>Esplanada</b>	Cria e recria.	Brasília – DF	1
<b>Pratinha</b>	Venda de genética.	Brasília - DF	1
<b>Santo Antônio</b>	Tourinhos nelore.	Cabeceira Grande – MG	2
<b>3 Poderes</b>	Venda de genética.	Brasília -DF	3
<b>Porteira Branca</b>	Cria.	Cristalina – GO	2
<b>São Francisco</b>	Genética de nelore super precoce.	Formosa – GO	5
<b>Rancho Tokarski</b>	Criação de Wagyu.	Planaltina – DF	2
<b>Entre Rios</b>	Tourinhos Guzerá e animais de pista.	Brasília – DF	2

<b>Sta. Cruz</b>	Cria, recria e animais de pista.	Iaciara – GO	1
<b>LASA</b>	Cria, recria e confinamento.	Ipameri -GO	1
<b>Quality</b>	Cria.	Campo Alegre de Goiás – GO	1

Também foi realizado durante o estágio o acompanhamento e tratamento de algumas afecções do sistema reprodutor como: 1 prolapso uterino, 4 Cistos folicular, 3 piometras, injuria ovaria (tratamento com CTM) e 3 partos distócicos, um resultando em cesariana.

No laboratório de sêmen foram analisadas e tabuladas 227 amostras de sêmen congelado bovino, 4 amostras resfriado de suíno e 2 amostras equinas sendo uma congelada outra resfriada.

## **CAPÍTULO 2**

**Utilização de células-tronco mesenquimal em fêmeas bovinas - relato de dois casos.**

**Utilização de células-tronco mesenquimal em fêmeas bovinas - relato de dois casos.**

*Utilization of mesenchymal stem cells in bovine females - report of two cases.*

Luís Gustavo Lopes Silva<sup>1\*</sup>, Maurício Antônio Silva Peixer<sup>2</sup>, Wesley José de Souza<sup>1</sup>.

**RESUMO**

A produção *in vitro* de embriões é a principal ferramenta de multiplicação de uma fêmea, no melhoramento genético de rebanhos. O Brasil é líder mundial nesta tecnologia e vem exportando este conhecimento nos últimos anos. Entretanto, a punção folicular (OPU – *ovum pick-up*) para recuperação ovocitária causa lesões ovarianas importantes, que por muitas vezes são irreversíveis. Este fato diminui a produção de embriões e a vida reprodutiva de uma fêmea, em programas de multiplicação animal. Duas fêmeas bovinas da raça nelore apresentaram pontos de maior ecogenicidade nos ovários e baixo índice na produção de ovócitos, embriões e prenhezes, ambas apresentavam histórico de várias OPU, sendo todos os fatores indicativos de injúria ovariana. Após a punção folicular os animais foram submetidos ao protocolo de aplicação de células-tronco mesenquimais (CTM) intra-ovariana e avaliados os resultados produtivos nas três punções seguinte, com um intervalo de quinze dias entre elas. Posteriormente os dados foram comparados com os resultados de três aspirações antecedentes ao tratamento com CTM. O tratamento foi efetivo nos dois animais resultando em melhora dos aspectos comparados.

Palavras-chave: aspiração folicular, CTM, melhoramento genético, ovário.

1 – Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, Medicina Veterinária, Urutaí, Goiás, Brasil.

2 – BIO – Biotecnologia em Reprodução Animal, Brasília, Distrito Federal, Brasil

\*luisgustavolopes96@hotmail.com

**SUMMARY**

Embryo production in vitro is the main animal multiplication tool to increase the amount of products of a female in the genetic improvement of herds. Brazil is a world leader in this technology and has been exporting this knowledge in recent years. However, ovum pick-up (OPU) for oocyte recovery causes important ovarian lesions, which are often irreversible. This fact decreases the production of embryos and the reproductive life of a female in animal multiplication programs. Two Nellore bovine females showed higher echogenicity in the ovaries and a low index in oocyte, embryo and pregnancy production, both had a history of several OPU, all factors indicating ovarian injury. After follicular puncture, the animals were submitted to the intra-ovarian mesenchymal stem cell (MCT) application protocol and the productive results were evaluated in the following three punctures, with an interval of fifteen days between them. Subsequently the data were compared with the results of three aspirations prior to treatment with MSC. The treatment was effective in both animals resulting in improvement of the compared aspects.

Keywords: follicular aspiration, MSC, genetic improvement, ovary.

## INTRODUÇÃO

A transferência de embriões tem um importante papel na multiplicação de fêmeas com alto valor genético. No Brasil a metodologia mais utilizada é a punção folicular (OPU – *ovum pick-up*) para produção *in vitro* de embriões (PIVE). O país é atualmente o maior produtor de embriões bovinos *in vitro* no mundo, com cerca de 400.000 embriões produzidos por ano Viana, et al (2018).

A OPU associada à PIVE, foi inicialmente utilizada na produção de animais com alto valor genético, com problemas de fertilidade adquiridos, ou ainda para fêmeas que não respondiam aos tratamentos super ovulatórios convencionais. Hoje, a técnica apresenta um potencial de produção de embriões e gestações superior às técnicas convencionais, sobretudo quando se trata de raças zebuínas, uma vez que estas raças apresentam uma dinâmica folicular diferente das raças taurinas e como maior número de folículos antrais.

A aspiração de ovócitos por meio da ultrassonografia, quando comparadas à laparotomia ou à laparoscopia é menos agressiva a fêmea e possui menor tempo de recuperação do animal. Entretanto, quando não realizadas de forma comedida e precisa, pode levar à inúmeros problemas de fertilidade, tais como inflamações, aderências, fibroses e outras patologias irreversíveis (Viana et al, 2003). Estas lesões levam a uma menor produção de ovócitos e embriões, tanto do ponto de vista quantitativo como qualitativo.

Os animais com problemas reprodutivos são afastados do programa de reprodução animal causando perdas no melhoramento genético por se tratar de animais de alto valor zootécnico e também perdas econômicas ao produtor pensando no alto valor comercial destes.

As células-tronco mesenquimais (CTM) têm grande potencial de autorrenovação e regeneração, portanto, poderiam ser muito eficazes no tratamento da insuficiência ovariana e da infertilidade (Sheikhansari et al, 2018). Neste sentido, Takehara et al (2013), demonstrou em seu experimento que as CTM originárias de tecido adiposo são capazes de induzir a angiogênese e restaurar o número de folículos, bem como corpo lúteo nos ovários. Concluem ainda, que as CTM podem ter um papel na restauração da função ovariana danificada e podem ser uma alternativa para a medicina regenerativa.

As CTM possuem tropismo por tecidos inflamados (Liu et al, 2014) e são administradas por várias vias (injeção local, injeção sistêmica, transplantação em matriz sintética), estudos mostram que as CTM agiriam como produtoras de agentes tróficos que induziriam os reparos teciduais através de fatores parácrinos secretados por elas (Phinney; Prockop, 2007).

O presente relato tem por objetivo descrever dois casos de vacas tratadas com a terapia celular visando melhora na produtividade e qualidade de ovócitos, embriões e prenhez.

#### **RELATO DE CASO**

Duas fêmeas bovinas adultas da raça nelore da mesma fazenda criadas a pasto com alimentação a cocho usando silagem apresentaram pontos de maior ecogenicidade nos ovários durante o exame de ultrassonografia de avaliação de doadoras. No histórico reprodutivo as vacas apresentavam baixo índice na produção de ovócitos, embriões e prenhez, ambas já haviam passado por várias OPU, sendo todos os fatores supracitados indicativos de injúria ovariana.

Foram observadas três aspirações foliculares de cada animal registrando os índices de conversão delas, sendo a Vaca 1 com média de 10 ovócitos viáveis por

aspiração, convertendo em 4 embriões e 0,7 gestações por aspiração. A vaca 2 com médias 8, 3 e 2 de ovócitos viáveis, embriões e gestações respectivamente.

Ao exame físico os animais não apresentaram nenhuma inflamação aparente, com sistema reprodutor íntegro sem nenhuma afecção que poderia levar maiores danos aos ovários, ausência de febre e não se observou nenhum linfonodo reativo, classificando esses animais como aptos para o tratamento de aplicação de células-tronco mesenquimais intra-ovariano.

As CTM bovinas foram adquiridas com a empresa BIO Cell – terapia celular, que já vieram descongeladas na concentração final de  $2,5 \times 10^6$  células, prontas para a utilização.

Para a aplicação as vacas foram submetidas a técnica de OPU, levando a um processo inflamatório nos ovários, assim possibilitando a ação das células-tronco mesenquimais. Posteriormente as células foram aplicadas através da mesma haste guia para aspiração folicular com o auxílio do ultrassom.

Após a aplicação foram aguardados 15 dias para observar a resposta ao tratamento. Com isso foi realizada 3 OPU em cada animal com 15, 30 e 45 dias após a aplicação para conseguir uma média de produção ovariana após o tratamento.

Para não haver interferência externas foi pedido ao laboratório que usasse o mesmo protocolo de produção *in vitro* de embriões que antes da aplicação das CTM, o acasalamento escolhido para cada animal foi o usual também usado nas 3 aspirações antecedentes ao tratamento.

A produção ovariana média de cada animal após a aplicação pode ser observada na Tabela 1.

Tabela 1- Média de ovócitos, embriões e gestações após o tratamento com CTM.

<b>Fêmeas</b>	<b>Ovócitos viáveis</b>	<b>Embriões</b>	<b>Gestações</b>
<b>Vaca 1</b>	17	9	5
<b>Vaca 2</b>	13	7	5

As médias individuais das vacas antes e depois do tratamento com células-tronco foram comparadas (tabela 2) para análise da eficácia do tratamento uma vez que o mesmo não pode ser avaliado por parâmetros do animal e sim da sua produção.

Tabela 2- Número médio de gestações antes e após o tratamento com CTM.

<b>Fêmeas</b>	<b>Média de prenhez sem CTM</b>	<b>Média de prenhez após tratamento com CTM</b>	<b>Diferença após a aplicação de CTM</b>
<b>Vaca 1</b>	0,7	5	4,3
<b>Vaca 2</b>	2	5	3

Com o tratamento foi observado melhora na produção ovariana e consequentemente gerando um aumento de 370% na taxa de gestação dos animais.

### **Discussão**

Não foi observado nenhum efeito adverso ao tratamento o que difere do trabalho de Yoon 2019 que descreve o aparecimento de efeitos adversos leves no uso de CTM na aplicação intra-ovarina em mulheres. O mesmo trabalho alerta sobre o perigo de aparecimento de tumores e metástases com o uso da terapia celular. O que difere do estudo realizado por Takehara e colaboradores em 2013 que não notou a formação de tumores

quando aplicada células-tronco mesenquimais de origem do tecido adiposo humano em camundongos.

Apesar de ter sido observado o aumento de ovócitos viáveis acredita-se que esse fator não correu pela formação de novos gametas e sim pela influência das CTM nas células do folículo assim favorecendo a qualidade dos oócitos. Costa 2016 afirma que o uso da terapia celular é um importante fator terapêutico que pode ajudar em problemas reprodutivos e aumentar índices na produção de animais de alto valor zootécnico, porém para a formação de novos oócitos após o nascimento demanda mais estudos com o uso de diferentes células-tronco mesenquimais.

O tratamento com CTM em cabras não alteram a quantidade e qualidade dos ovócitos recuperados após várias aspirações foliculares por laparoscopia (Barçante 2018).

Em bovinos resultados positivos, com a utilização de células-tronco, foram observados por Soares et al., 2018. O estudo com 27 vacas da raça nelore mostra que os animais tratados tiveram aumento significativo na taxa de recuperação oocitária, ovócitos viáveis e embriões de melhor qualidade (blastocisto eclodido). Mostrando resultados que equiparam ao tratamento executado.

## **CONCLUSÃO**

O tratamento demonstrou êxito, as CTM aplicadas em vacas com alterações patológicas crônicas nos ovários, em função de repetidas OPU, melhorando a função ovariana e proporcionando evolução quantitativa e qualitativa na morfologia dos ovócitos, que resultou em aumento da quantidade de embriões obtidos e elevou, conseqüentemente, o número de gestações.

**REFERÊNCIAS**

- BARÇANTE, F. P. S. Ensaio clínico com células-tronco mesenquimais (CTM) na recuperação de ovários de cabras submetidas a múltiplas aspirações foliculares por laparoscopia (LOPU). 2018. 71 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – Universidade Federal do Piauí, Tersina, 2018
- COSTA, J. J. N. Expressão de marcadores de células germinativas e de oócitos em fibroblastos bovinos tratados com 5-aza-citidina e em células-tronco adultas cultivadas *in vitro* na presença de BMP-2, BMP-4 ou fluido folicular. 2016. 208 f. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2016.
- LIU J1, ZHANG H2, ZHANG Y3, LI N3, WEN Y3, CAO F3, AI H1, XUE X4. Homing and restorative effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on cisplatin injured ovaries in rats. *Mol Cells*. 2014 Dec 31;37(12):865-72. doi: 10.14348/molcells.2014.0145. Epub 2014 Nov 10.
- PHINNEY, D. G.; PROCKOP, D. J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*, v. 25, n. 11, p. 2896-2902, 2007.
- SHEIKHANSARI G, AGHEBATI-MALEKI L, NOURI M, JADIDI-NIARAGH F, YOUSEFI M. CURRENT. Approaches for the treatment of premature ovarian failure with stem cell therapy. *Biomed Pharmacother* 2018;102:254-62.
- SOARES JG, ROSSI GF, BAYEUX BM, MORAES GFA, ELLIFF, FM, WATANABE YF, MONTEIRO FM, RODRIGUES NN, SALES JNS, NOGUEIRA MFG, BARUSELLI PS, LO TURCO EG. Effect of stem cells application on the

oocyte and embryo production of bovine females. *Anim Reprod*, v.15, p.521, 2018.

TAKEHARA, Y.; YABUUCHI, A.; EZOE, K.; KURODA, T.; YAMADERA, R.; SANO, C.; MURATA, N.; AIDA, T.; NAKAMA, K.; AONO, F.; AOYAMA, N.; KATO, K.; KATO, O. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. *Laboratory Investigation*, v. 93, n. 2, p. 181–193, 2013.

VIANA, J. H. M. et al. Caracterização de seqüelas subseqüentes à punção folicular em bovinos. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 23, n. 3, p. 119–124, 2003.

VIANA, J. H. M, Figueiredo ACS Gonçalves RLR, Siqueira LGB A historical perspective of embryo-related technologies in South America, *Proceedings of the 10th International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS 2018)*; Foz do Iguaçu, PR, Brazil, September 16th to 20th, 2018.

YOON, SOOK. (2019). Mesenchymal stem cells for restoration of ovarian function. *Clinical and experimental reproductive medicine*. 46. 1-7. 10.5653/cerm.2019.46.1.1. *Clinical and experimental reproductive medicine*.

**ANEXO (NORMAS DO PERIÓDICO)**

Fonte: Times New Roman

Número: 12

Margens: 3,0 esquerda e direita / 3,0 inferior e superior

Espaçamento entre linhas: 2