



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



**ÉVERTON ROSA DOMINGUES**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO  
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM TEMPO FIXO EM BOVINOS**

ARAGUAÍNA / TO  
2017

**ÉVERTON ROSA DOMINGUES**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO  
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM TEMPO FIXO EM BOVINOS**

Relatório apresentado à Escola de  
Medicina Veterinária e Zootecnia, como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
Médico Veterinário

**Orientador:** Prof. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias  
**Supervisor:** M.V Alexandre Sardinha Cavilhêdo



**ÉVERTON ROSA DOMINGUES**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO:  
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM TEMPO FIXO EM BOVINOS**

Relatório apresentado à  
Escola de Medicina  
Veterinária e Zootecnia,  
como requisito parcial para  
obtenção do grau de Médico  
Veterinário.

**Orientador:** Prof. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias

Aprovado : \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias  
(Orientador)

---

Prof. Dra. Ana Kelen Felipe Lima  
(Examinador 1)

---

Prof. Dra. Cátia Maria de Oliveira Lobo  
(Examinador 2)

## **Dedico**

Bem como todas as minhas conquistas, a minha mãe Gizelda, ao meu pai Maximiano “In memoriam” e meu irmão Jáder, vocês todos são os meus maiores presentes.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu gostaria de agradecer a **Deus** por estar sempre ao meu lado durante todos os momentos de minha vida e principalmente aos que passei na faculdade.

Agradecer a minha **mãe** que esteve sempre do meu lado me apoiando, me dando força pra seguir em frente, abdicando de viagens, passeios e outras coisas, tudo pra me proporcionar o melhor pra estudar. Ao meu saudoso **pai** (*in memoriam*) que sempre me apoiou e sei que continua sempre assim. Ao meu **irmão** que, apesar de fazer outro curso me ensinou quando precisei e me motivou a seguir em frente diante das adversidades que surgirão durante a faculdade.

Um agradecimento muito especial a uma **professora** que nem imagina como o poder da palavra pode mudar nossas vidas e também nosso destino, me refiro a grande professora Dra. Ana Paula Coelho Ribeiro, que num momento difícil de minha vida ela veio conversar comigo me incentivando a seguir o meu sonho mesmo que o caminho fosse difícil. E foi o que eu fiz e estou muito feliz por ter seguido a sua recomendação que resultou nesta monografia.

A minha grande orientadora e amiga, **professora** Dra. Francisca Elda Ferreira Dias, a quem devo muito na área de reprodução. Sempre teve todo tempo do mundo pra conversar comigo, me perguntando sobre o meu andamento na faculdade, me puxando a orelha quando preciso, e me avisando sobre os cursos e palestras da área de reprodução e pela sua orientação neste trabalho.

Ao meu supervisor de estágio, **Médico Veterinário** Dr. Alexandre Sardinha Cavalcêdo, por todos os ensinamentos, pela paciência e por ter concedido essa oportunidade única de aprendizagem. Aos médicos veterinários Luiz Antônio Abadia, Waldyr Velloso de Almeida Filho e Victor Hugo Alves de Oliveira pela paciência, tranquilidade na realização dos trabalhos e a conhecimentos adquiridos durante o estágio.

A toda equipe da **empresa** Embriotec Reprodução Animal LTDA, por toda a atenção dada a mim e pela contribuição para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao **corpo docente** da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMVZ), aos funcionários e em especial aos professores pelos ensinamentos e experiências adquiridas ao longo da vida acadêmica. A Universidade Federal do Tocantins (UFT) por toda infraestrutura oferecidas a nós estudantes.

A todos os meus **colegas** da faculdade que me ajudaram quando eu precisei, me consolando, trocando ideias, me divertindo muito e conhecendo locais diferentes além da faculdade. Em especial ao Tarcizo Martins Trajano, Ozias Alves da Cruz, Bergson Pereira de Lima, e Jailson Marinho da Silva.

Agradeço também a uma pessoa muito especial que entrou em minha vida trazendo alegria e causando grandes mudanças positivas, a minha **namorada** Rosiane Conceição dos Santos.

Obrigado!

## **RESUMO**

Este relatório descreve as atividades desenvolvidas durante o estágio curricular supervisionado obrigatório na empresa Embriotec Reprodução Animal LTDA, realizado no período de 02 de agosto de 2017 a 15 de outubro de 2017, totalizando 360 horas, sob a orientação da professora Dra. Francisca Elda Ferreira Dias e supervisão do M.V. Dr. Alexandre Sardinha Cavilhêdo. Durante o período de estágio foram desenvolvidas atividades relacionadas à reprodução de bovinos, destacando-se exames andrológicos em touros, exames ultrassonográficos de diagnóstico de gestação, protocolos de transferência de embrião em tempo fixo, entre outras atividades. As atividades foram desenvolvidas em propriedades rurais localizadas no estado de Goiás e em propriedades da empresa. No presente relatório consta uma descrição mais detalhada da Biotecnologia Transferência de Embriões em Tempo Fixo (TETF)

**Palavras-chave:** Bovinos, Biotécnicas, Embriões, Reprodução.

## **ABSTRACT**

This report describes the activities developed during the required supervised curricular internship at Embriotec Animal Reproduction Company, held in the period from August 2, 2017 to October 15, 2017, totaling 360 hours, under the guidance of Professor Francisca Elda Ferreira Dias and supervision of MV Dr. Alexandre Sardinha Cavilhêdo. During the internship period, several activities related to bovine reproduction were developed, among them, andrological examinations in bulls, ultrasound examinations of pregnancy diagnosis, embryo transfer protocols at fixed time, among other activities. All activities were developed in rural properties located in the state of Goiás and in the company's properties. This report provides a more detailed description of the biotechnology embryo transfer at fixed time (TETF).

**Key words:** Cattle, Reproduction, Biotechniques, Embryos

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CIV</b>	Cultivo in vitro de Embriões
<b>FIV</b>	Fertilização in vitro de Embriões
<b>FSH</b>	Hormônio Folículo-Estimulante
<b>GnRH</b>	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
<b>IA</b>	Inseminação Artificial
<b>LH</b>	Hormônio Folículo-Estimulante
<b>MIV</b>	Maturação in vitro de Embriões
<b>M.V.</b>	Médico Veterinário
<b>OPU</b>	<i>Ovum Pick-up</i> (Aspiração Folicular)
<b>PGF2<math>\alpha</math></b>	Prostaglandina
<b>P<sub>4</sub></b>	Progesterona
<b>PIVE</b>	Produção <i>in vitro</i> de Embriões
<b>TE</b>	Transferência de Embriões

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Empresa Embriotec Reprodução Animal LTDA, sede do escritório e laboratórios localizada em Anápolis, Goiás.....	2
<b>Figura 2:</b> Acima, da esquerda para direita, curral de recepção dos animais; escritório, laboratório e sala de aula; brete de contenção e as doadoras da empresa Embriotec Reprodução Animal LTDA.....	3
<b>Figura 3:</b> Protocolo hormonal de sincronização das receptoras de embriões bovinos.....	8
<b>Figura 4:</b> Protocolo hormonal de sincronização das doadoras de embriões bovinos.....	9
<b>Figura 5:</b> Classificação dos embriões quanto à qualidade.....	14

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Transferência de Embriões em Tempo Fixo.....</b>	<b>5</b>
2.1.1– Pré-requisito Sanitário das Doadoras e Receptoras.....	5
2.1.2– Seleção das Receptoras.....	6
2.1.3– Seleção das Doadoras.....	7
2.1.4– Sincronização das Receptoras.....	8
2.1.5– Sincronização das Doadoras.....	9
2.1.6 - Aspiração Folicular Guiada por Ultrassonografia.....	10
2.1.7– Produção <i>In Vitro</i> de Embriões (PIVE).....	11
2.1.7.1 - Maturação <i>In Vitro</i> (MIV).....	12
2.1.7.2 - Fertilização <i>In Vitro</i> (FIV).....	12
2.1.7.3 - Cultivo <i>In Vitro</i> (CIV).....	12
<b>2.2. Classificação dos Embriões.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3. Transferência de Embriões (inovulação).....</b>	<b>14</b>
<b>3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>17</b>
<b>4. BIBLIOGRAFIAS.....</b>	<b>18</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Este relatório descreve as atividades realizadas em Estágio Curricular Supervisionado do curso de Medicina Veterinária da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins, realizado no período de 02 de agosto a 15 de outubro de 2017, totalizando 360 horas, sob orientação da professora Dra. Francisca Elda Ferreiras Dias e supervisão do médico veterinário Dr. Alexandre Sardinha Cavalcêdo. O estágio foi realizado na empresa Embriotec Reprodução Animal LTDA, sendo as atividades desenvolvidas na propriedade da empresa e nas propriedades rurais localizadas na região do estado de Goiás.

A reprodução animal utilizando o manejo de fêmeas bovinas foi à área de maior concentração do estágio, onde se destacou a importância do cuidado reprodutivo das fêmeas e algumas das biotecnologias utilizadas na reprodução, como Aspiração Folicular (OPU), Sexagem Fetal, Inseminação Artificial (IA) e Transferência de Embriões em Tempo Fixo (TETF). Destas, a TETF foi a biotecnologia objetivo principal do estágio e deste relatório.

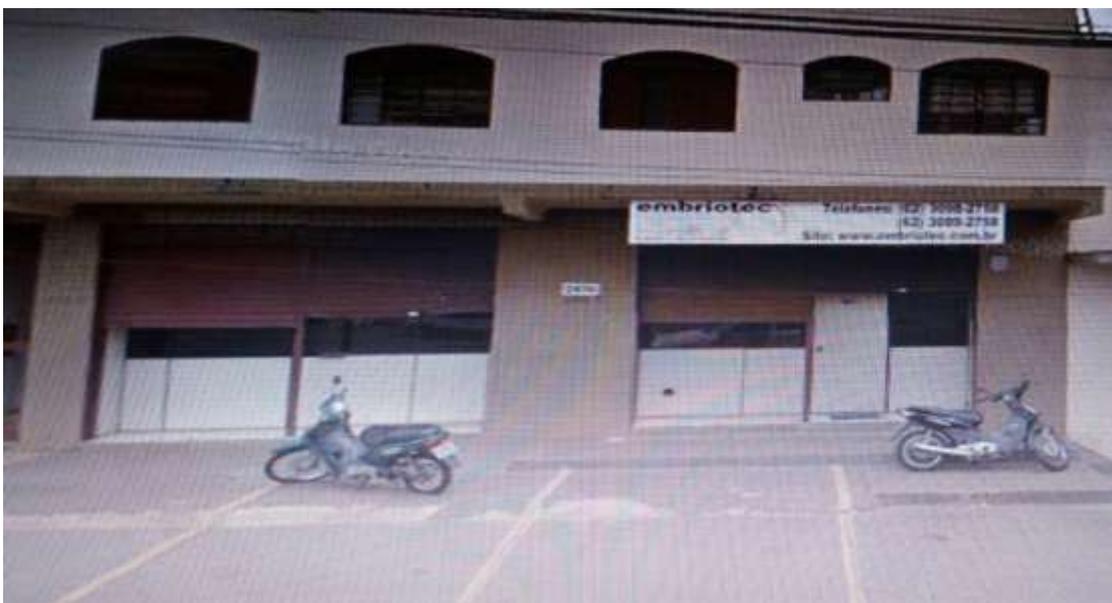
A TETF permite avanços mais rápidos no melhoramento animal, diminuindo o intervalo entre gerações e possibilita o melhoramento genético. O melhoramento consiste na utilização de animais com maior desenvolvimento ponderal, rendimento de carcaça, produção leiteira, capacidade de conversão alimentar, precocidade, dentre outros atributos de interesse para o produtor na pecuária de corte ou de leite e com isso podendo ampliar a lucratividade do negócio.

Esta biotecnologia tem sido muito estudada para que possa ser difundida entre os pecuaristas e profissionais da área e tornando-se mais acessível.

A empresa Embriotec Reprodução Animal LTDA situa-se na cidade de Anápolis-GO e foi fundada em 1999. A empresa foi iniciada em Padre Bernardo-GO, porém, atualmente o escritório e o laboratório de Produção *in vitro* de Embriões (PIVE) (Figura 1) situa-se na cidade de Anápolis-GO, atuando em diversas regiões do país, com clientes no Nordeste, Sudeste, Norte e Centro-Oeste.

A equipe técnica é formada por cinco médicos veterinários permanentes e um veterinário terceirizado. Além desta equipe técnica, existem outros colaboradores atuando na recepção, setor financeiro, comercial, duas funcionárias no laboratório de PIVE e outros dois funcionários que trabalham a campo nas OPU's com rastreamento e seleção de oócitos. A empresa possui duas fazendas (Figura 2), uma em Anápolis e a outra em São Gabriel-GO, onde são realizados serviços de TE para clientes e para a própria empresa respectivamente, totalizando nove funcionários distribuídos nessas fazendas.

A fazenda sediada em Anápolis conta com uma estrutura pronta pra receber doadoras e touros de clientes, possuindo laboratório de produção de meios de cultivo, congelamento de sêmen, seleção inicial dos oócitos coletados, equipamentos para a lavagem e higienização do material de laboratório, além de escritório e sala de aula para realização de cursos. A fazenda de Belos Padros (São Gabriel-GO) é utilizada apenas para manter as receptoras.



**Figura 1.** Empresa Embriotec Reprodução Animal LTDA, sede do escritório e laboratórios localizada em Anápolis, Goiás. Fonte: Arquivo pessoal.



**Figura 2.** Acima, da esquerda para direita, curral de recepção dos animais; escritório, laboratório e sala de aula; brete de contenção e as doadoras da empresa Embriotec Reprodução Animal LTDA. Fonte: Arquivo pessoal.

## 2. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o estágio, realizado na empresa Embriotec Reprodução Animal LTDA, foram desenvolvidas atividades relacionadas à da Reprodução Animal, uso de biotécnicas e a realização de exames complementares para o recebimento de novo animais.

As práticas eram supervisionadas por médicos veterinários e nelas ocorreram: diagnóstico de gestação aos 30 dias após inovulação para confirmação de prenhez, exames ginecológicos e andrológicos nos animais que iriam participar de protocolos de TETF, IA, OPU ou coleta de sêmen, avaliação da fertilidade de novilhas adquiridas, coleta de material e interpretação laboratorial para exames de Brucelose e teste de tuberculina para animais recém adquiridos, além de análises e congelamento de sêmen. Ocorreram visitas técnicas em propriedades rurais com o objetivo de realizar avaliação da condição corporal do rebanho, verificação do calendário sanitário da fazenda e a seleção dos melhores animais dos clientes a serem utilizados nos protocolos de reprodução.

De todas as atividades desenvolvidas, a TETF será o foco do presente relatório. Na tabela 1 observa-se um o resumo das principais atividades acompanhadas no durante o período de Estágio.

**Tabela 1.** Atividades desenvolvidas durante o período de estágio curricular supervisionado obrigatório na área de Reprodução Animal e técnicas praticadas na empresa Embriotec Reprodução Animal LTDA, Anápolis-GO, 2017.

<b>Atividades realizadas</b>	<b>Quantidade de Animais</b>	<b>Quantidade (horas)</b>
Avaliação de receptoras	644	40
Aspiração Folicular – OPU	60	20
Laboratório	-	16
Transferência de Embriões	980	120
Diagnostico de Gestação de Embriões Transferidos	540	80
Sexagem Fetal	378	60
Exames de Brucelose e Tuberculose	50	12
Andrológico	2	12
Visitas técnicas	644	-
<b>Total</b>	<b>2654</b>	<b>360</b>

## 2.1. Transferência de Embriões em Tempo Fixo (TETF)

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, com 218,23 milhões de cabeças de gado em 2016 (BEEFPOINT, 2017). Porém, as atuais condições de vida estão ameaçadas devido o risco da devastação com a abertura de novas áreas para a criação de gado, comprometendo a qualidade das futuras gerações, por isso, o modo de produção e consumo traz sérias ameaças a população (RUFINO *et al.*, 2006; MARTINS, 2010).

Desta forma, o mundo precisa de soluções que busquem o aumento da produção de alimentos, sem, no entanto, comprometer mais ainda o meio ambiente, garantindo à população maior segurança alimentar e condições de igualdade (RUFINO *et al.*, 2006).

Nesse sentido, devemos intensificar o uso de biotecnologias que viabilizem melhorar os índices reprodutivos, bem como a ocorrência de 1 parto/ano/vaca. Dentre as biotecnologias, a TETF vem crescendo e conquistando novos adeptos a essa técnica.

A TETF consiste na transferência de embriões de uma doadora para uma receptora, onde esta tem como função conduzir a gestação a termo. Tem como principal atrativo a garantia de multiplicação do rebanho em larga escala, por meio da aplicação de hormônios e medicamentos que induzem a ovulação das fêmeas em dia e hora marcados. Com isso, consegue-se ter um rebanho de alta qualidade na primeira geração devido essa tecnologia permitir a seleção da fêmea e do macho (HAFEZ e HAFEZ, 2004; GONÇALVES *et al.*, 2008). A seguir, as etapas da TETF praticadas na empresa Embriotec Reprodução Animal LTDA serão detalhadas.

### 2.1.1- Pré-requisito Sanitário das Doadoras e Receptoras

Os animais envolvidos na TETF preferencialmente devem ser oriundos de propriedades com rebanhos hígidos, sem qualquer relato nos últimos seis meses de doenças infectocontagiosas como a Brucelose, Tuberculose, Leucose, Raiva, dentre outras (GONÇALVES *et al.*, 2008). Antes de iniciar os trabalhos, os animais eram examinados por seu comportamento entre os demais animais e posteriormente eram submetidos a um exame mais

minucioso, descartando-se aqueles que fossem portadores de catarro genital ou de qualquer alteração do estado clínico, sendo esse animal afastado dos demais do grupo (GONÇALVES *et al.*, 2008).

O primeiro cuidado sanitário preconizado pela empresa, no início de qualquer trabalho eram os exames de Brucelose e Tuberculose. Principalmente no ato de aquisição de receptoras provenientes de diferentes rebanhos, que na maioria das vezes não tem um controle sanitário tão rigoroso para tal trabalho, é interessante que se tenha uma área de quarentena para os animais adquiridos de outras propriedades, evitando assim a introdução de doenças no rebanho de animais (SANTOS, 2011).

### *2.1.2 - Seleção das Receptoras*

Num programa de TETF, as receptoras constituem também uma parte fundamental, pois devem conceber e levar a gestação a termo. A aquisição desses animais representa um custo elevado, a manutenção é dispendiosa e o estado de saúde é crítico para o êxito da TETF. As novilhas e as fêmeas múltiparas que apresentem ciclo estral regular, que tenham parido há no mínimo 60 dias, que o puerpério tenha decorrido normalmente e que estejam livres de doenças e anomalias do trato reprodutivo podem ser selecionadas como receptoras de embriões (GONÇALVES *et al.*, 2008).

O ideal é o aproveitamento das receptoras oriundas da própria fazenda, devido conhecer-se o seu histórico reprodutivo e de repassar a sua imunidade às viroses, bacterioses e parasitoses locais aos recém-nascidos (GONÇALVES *et al.*, 2008; SCARPELLI, 2003). Ao adquirir receptoras de outras propriedades devem estar com cria ao pé, passar por um período de quarentena, o grau de imunidade desses animais deve ser verificado por intermédio de exames laboratoriais contra as principais doenças reprodutivas como a Brucelose, Tuberculose, Leucose, Diarréia Viral Bovina e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina (GONÇALVES *et al.*, 2008; VALLE *et al.*, 2000).

As receptoras devem possuir uma boa estrutura corporal ao embrião que será implantado para garantir uma gestação a termo, livre de auxílio obstétrico, além de possuir uma boa habilidade materna e rusticidade (ANDRADE *et al.*, 2002).

De modo geral, uma doadora produz, em média, quatro a cinco embriões de boa qualidade em cada coleta. Em decorrência disso, deverão ser preparadas aproximadamente 10 receptoras realizando-se a sincronização do cio de todas, para obter aproximadamente seis receptoras sincronizadas com o cio da doadora, sendo aptas para receber um embrião (ALVAREZ, 2009)

Somente no dia da transferência deve ocorrer a seleção final de uma fêmea como receptora de embriões, em função, principalmente, dos sintomas de estro evidenciados após a sincronização e da avaliação do corpo lúteo cíclico (GONÇALVES *et al.*, 2008).

### 2.1.3 - Seleção das Doadoras

As doadoras usadas nos trabalhos de TETF são animais bem conceituados em relação aos demais da própria raça. São animais mais produtivos, puros e admirados nas feiras agropecuárias. Porém não basta ter todos esses requisitos. É prudente uma avaliação detalhada antes de iniciar um programa de TETF. Um dos pontos críticos de um programa de TE, é a utilização de animais sem distúrbios reprodutivos, com ciclo estral regular e em adequado estado nutricional (GONÇALVES *et al.*, 2008).

De acordo com Williams (2001), devemos incluir doadoras com pelo menos 60 dias pós-parto, com rigorosa observação da regularidade de, pelo menos, dois ciclos estrais consecutivos. Outro aspecto é o bem-estar das doadoras, com boas instalações, higiene, água e alimentação de boa qualidade e um ambiente com o mínimo de estresse para que as doadoras respondam de forma satisfatória aos tratamentos executados. Um acompanhamento da assistência técnica ou de um veterinário regularmente permite uma escolha mais fundamentada de boas doadoras, conseqüentemente, um aumento na eficiência na TETF. Tudo isso era realizado

A utilização de novilhas em programas de TE é estimulada porque reduz o intervalo entre gerações acelerando o melhoramento genético animal. Ao se utilizar novilhas como doadoras, elas devem ser submetidas a exames ginecológicos a partir dos 11 meses de idade, atentando-se à raça e à massa muscular desse animal que deve ser representativa de um animal adulto (GONÇALVES, *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2002).

Todas essas orientações eram repassadas aos clientes da empresa, porém, a escolha das doadoras que seriam utilizadas nos protocolos era de livre escolha dos clientes.

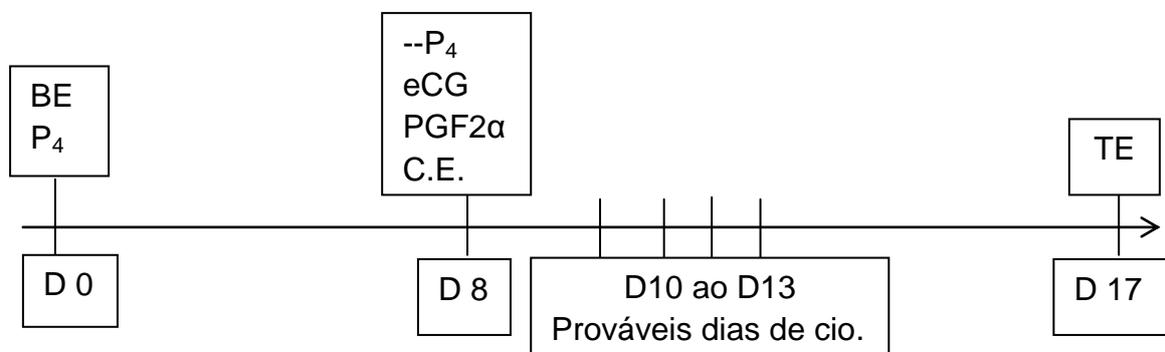
#### 2.1.4 - Sincronização das Receptoras

Realizar a detecção de cio em um grupo de fêmeas ciclando de forma aleatória é muito difícil, trabalhoso e consome muito tempo. A sincronização do cio e da ovulação permite que se estime com razoável precisão o cio desses animais.

A sincronização entre o estágio de desenvolvimento do embrião e o trato reprodutivo da receptora é um pré-requisito básico para o início de um protocolo de TETF. Isso geralmente é conseguido pela seleção de receptoras que estavam em cio ao mesmo tempo que a doadora, seja naturalmente ou como resultado da sincronização do cio.

Segundo Valentim e Gofert (2004), a sincronização de receptoras é fundamental para o sucesso da TE, sem ela seria necessário um número maior de receptoras para o uso do cio natural. Existem várias técnicas para a sincronização, desde as mais antigas a base de prostaglandina ( $\text{PGF2}\alpha$ ) aos mais modernos protocolos onde são usados vários hormônios e que utilizam a o conceito de sincronização de crescimento folicular e o da ovulação.

Durante o estágio, após todas as receptoras do lote serem submetidas ao exame clínico e aprovadas, elas eram submetidas aos protocolos de sincronização (Figura 3).



**FIGURA 3.** Protocolo hormonal de sincronização das receptoras de embriões bovinos.

Nos protocolos da empresa inicialmente utilizava-se Progesterona ( $P_4$ ), de livre escolha do cliente se seria um implante auricular ou intravaginal, utilizado na intenção de simular um corpo lúteo. O Benzoato de Estradiol (BE) era usado para simular um folículo dominante, promovendo assim a atresia folicular e promovendo assim a sincronia da próxima onda folicular. A Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) possui a função de promover o crescimento final do folículo dominante e promover a ovulação, mesma função do Hormônio luteinizante (LH). O Cipionato de Estradiol (CE) tem a mesma função do BE, porém seu tempo de meia vida é mais longo, por essa razão é utilizado posteriormente (tempo necessário para ocorrências da Transferência de Embrião). A Prostaglandina ( $PGF_{2\alpha}$ ) irá causar a isquemia nos vasos sanguíneos que irrigam o corpo lúteo, iniciando o processo de luteólise. Após a fêmea sincronizada, realiza-se a Transferência de Embrião (TE).

#### *2.1.5 - Sincronização das Doadoras*

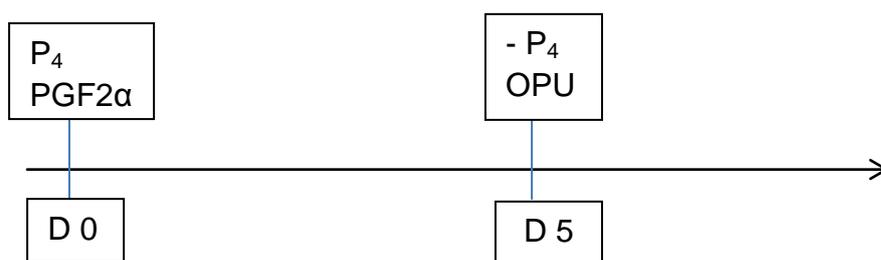
As doadoras são os animais mais valiosos do plantel, por isso as exigências e os cuidados devem ser redobrado.

Dias antes da Aspiração Folicular (OPU), esses animais eram submetidos a um tratamento hormonal (Figura 4), que visava o êxito no trabalho. O tratamento hormonal geralmente era utilizado nas fazendas de clientes novos, pois o veterinário da empresa não tinha o conhecimento do histórico reprodutivo desses animais. Em fazendas que se mantinha a regularidade do acompanhamento das doadoras, não havia a necessidade de tratamento hormonal, somente em casos de aquisição de novos animais ou distúrbios hormonais. As doadoras eram seguidamente submetidas ao exame de ultrassom, verificando assim o seu estado reprodutivo.

Outro cuidado preconizado era quanto a alimentação das doadoras. As inter-relações entre nutrição e reprodução em bovinos são bastante complexas e as respostas são diversificadas, algumas vezes inconstantes, explicando, em parte, os resultados inconsistentes na produção embrionária na TE (GONÇALVES et.al., 2008).

Conforme o grau e a duração da restrição alimentar na dependência da condição corporal, da idade e do nível de lactação, ocorrerão as variações nos

resultados. O fornecimento de dietas ricas em energia por curto período de tempo, no intuito de melhorar o estado corporal dos animais, pode aumentar a taxa de ovulação. Porém, seu uso contínuo e excessivo pode comprometer a resposta da quantidade e qualidade dos embriões, devido causar alterações nas concentrações de glicose, insulina e IGF-I (estimula a proliferação e a esteroidogênese das células da granulosa), interfira no crescimento folicular, bem como no pico de LH, resultando num maior número de cistos ovarianos (GONÇALVES *et.al.*, 2008).



**Figura 4.** Protocolo hormonal de sincronização das doadoras de embriões bovinos.

#### 2.1.6 - Aspiração Folicular Guiada por Ultrassonografia

A OPU transvaginal orientada por ultra-sonografia é a técnica de eleição para a obtenção de óocitos de doadoras vivas, em bovinos, destinados à PIVE. Esta biotecnologia encontra-se difundida por vários países, mas o Brasil alcançou uma posição de destaque frente ao número surpreendente de embriões produzidos por esta técnica no país (SENEDA, 2017).

Os óocitos utilizados na PIVE são geralmente aspirados de folículos com diâmetro entre 2 a 8 mm, pois folículos menores ainda não apresentam competência pra continuar o desenvolvimento, enquanto os que maiores de 8 mm encontram-se em atresia ou já iniciaram o processo de maturação, tornando-se inviáveis para a FIV (GONÇALVES *et al.*, 2008).

Através do exame ultra-sonográfico, as fêmeas com baixo potencial para o fornecimento de óocitos podem ser identificadas momentos antes da OPU (SENEDA, 2017).

Primeiramente, a doadora é conduzida ao brete de contenção, de maneira calma, evitando o máximo de estresse. Realiza-se a palpação retal

para verificar as condições dos ovários, após é realizada a lavagem da região perineal com água e sabão, enxague e a secagem com papel toalha. É realizada a analgesia epidural do animal, no espaço sacrococcígeo, com o anestésico lidocaína (3,5 ml/animal), ocorrendo uma redução na dosagem para a raça Gir (2 ml em vacas e 1,5 ml para novilhas), devido ser uma raça mais sensível.

A técnica é realizada utilizando-se um equipamento de ultrassom com auxílio de um transdutor micro convexo, que é acoplado a uma guia de aspiração, com uma agulha acoplada em sua extremidade. A pressão de vácuo é obtida com uma bomba de vácuo, ajustada entre 60 e 80 mm Hg, que levará os oócitos até um tubo de 50 mL (tubo Falcon). Com o auxílio de uma pessoa para que os lábios vulvares sejam abertos, e em seguida a guia de aspiração acoplada com o transdutor do ultrassom é inserida até o fundo do saco vaginal e com auxílio da manipulação retal, os ovários são posicionados para obtenção de uma boa visualização na tela do ultrassom. Os folículos visualizados serão aspirados. A lavagem da agulha e o meio de armazenamento dos oócitos são efetuados com PBS, acrescido de 5,0 UI/ml de Heparina, 50 mg/ml de Gentamicina e 1% de soro fetal bovino. Este sistema será acoplado a um tubo de 50 ml tipo Falcon. Portanto, o líquido aspirado passa por este sistema e se depositará no tubo. (SENEDA, 2017).

Com a técnica da OPU é possível realizar em animais a partir dos seis meses de vida, vacas prenhes até o terceiro mês de gestação, entre duas o três semanas após o parto. Em fêmeas gestantes é possível por que os ovários mantêm sua atividade durante a prenhez, tornando viável a recuperação dos oócitos (SENEDA, 2017).

A periodicidade da aspiração pode variar, em intervalos de duas semanas, durante várias semanas ou meses. Outra grande vantagem em relação a TE é de não ser preciso tratamento hormonal das doadoras com gonadotrofinas, algo benéfico principalmente às novilhas, pois a estimulação precoce pode causar edema mamário e síndrome do ovário cístico (BIOEMBRYO, 2017).

Durante o estágio, nos rebanhos em que não havia-se conhecimento das doadoras, após uma avaliação clínica do animal e sendo apta para aspiração, era colocado o implante intravaginal ou auricular, e posteriormente,

era injetado 2 ml de Benzoato de Estradiol e 2 ml de PGF2 $\alpha$  iniciando assim no dia zero o tratamento. No sexto dia, após a retirada do implante o veterinário realizava a aspiração da doadora.

#### 2.1.7 - Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE)

Durante o estágio, não era permitido estágio no laboratório, então nesse ponto irei comentar conceitos e algumas poucas coisas serão relatadas sobre como era na empresa.

A FIV é considerada a terceira geração de biotecnologia aplicada ao melhoramento genético, após a IA e a TE. No início da década de 90, com a introdução da Aspiração Folicular guiada por ultrassonografia, seguida pela PIVE, a expectativa no incremento da produtividade das fêmeas aumentou (RENESTO, 2004).

No Brasil, a produção comercial de embriões começou no ano de 1998. O aprimoramento de sistemas envolvidos no processo de produção *in vitro* (PIVE) de embriões na espécie bovina a partir de oócitos recuperados de folículos de ovários de vacas abatidas tem sido fundamental para o estudo e a compreensão de vários fenômenos e mecanismos biológicos que ocorrem durante este período, desde a maturação dos oócitos, o processo de capacitação espermática e fertilização, até o início do desenvolvimento embrionário em fase de pré-implantação (YAMAZAKI, 2017).

O processo de produção *in vitro* de embriões (PIV) é basicamente constituído por três etapas: a maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV), os quais simulam os eventos biológicos que ocorrem no aparelho reprodutor da fêmea (BIOEMBRYO, 2017), conforme descrito abaixo:

2.1.7.1 - Maturação *In Vitro* (MIV) - Os oócitos aspirados do interior do folículo se encontram inaptos para serem fecundados, precisando ocorrer uma série de transformações em seu núcleo e citoplasma, que consiste na maturação oocitária. Em condições naturais (*in vivo*), a maturação tem início logo após o pico pré-ovulatório de LH, no caso da aspiração folicular esse processo começa com a remoção do oócito de dentro do folículo ovariano. Em bovinos, esse processo ocorre durante o período de 24 horas, com progressão do

estádio de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica para o estágio de metáfase II (GONÇALVES *et al.*, 2008).

Após o tempo de incubação da MIV, os oócitos completam a maturação com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e estão prontos para a fecundação. Em condições ideais, mais de 90% dos oócitos se encontram em metáfase II após a MIV (GARCIA *et al.*, 2012)

2.1.7.2 - Fertilização *In Vitro* (FIV) - Para a ocorrência deste evento é necessário a completa maturação do oócito e a capacitação do espermatozóide, que consiste em uma série de modificações bioquímicas que irá possibilitar a sua capacidade de penetração no oócito. O sêmen utilizado pode ser congelado ou fresco, necessitando serem processados em laboratório de maneira que sejam obtidos apenas os espermatozoides vivos, livres de impurezas ou fatores indesejáveis. Em geral, a concentração de espermatozóide utilizada é de  $2 \times 10^6$ /ml, sendo calculada de acordo com a motilidade e a concentração da fração viva (BIOEMBRYO, 2017). O período de incubação dos oócitos com os espermatozoides varia de 6 a 20 horas.

2.1.7.3 - Cultivo *In Vitro* (CIV) - essa etapa corresponde ao desenvolvimento do oócito fertilizado ao estágio de blastocisto. Durante este período pré-implantação ocorrerão eventos como a ativação do genoma embrionário, clivagem, compactação dos blastômeros no estágio de mórula, início da diferenciação embrionária, células do trofoblasto darão origem à placenta e anexos fetais, e células da massa celular interna, que formarão o feto propriamente dito e com a formação da blastocele. O desenvolvimento embrionário *in vitro* é avaliado no 6º dia de cultivo visualizando-se a compactação dos blastômeros e início da formação da blastocele, sendo que no 7º dia é feita a seleção e a avaliação final dos embriões os quais são envasados individualmente em palhetas, identificando-as, para posteriormente transferi-los (inovulação) para as receptoras ou serem congelados (BIOEMBRYO, 2017; GONÇALVES *et al.*, 2008; GARCIA, 2012).

## 2.2. CLASSIFICAÇÃO DOS EMBRIÕES

A qualidade do embrião é o fator que mais influencia os resultados de prenhez da TE (GONÇALVES *et al.*, 2008). Estruturas que se apresentam viáveis, aptas ao desenvolvimento pós-implantação e com maior tolerância ao congelamento normalmente correspondem a estruturas com boa aparência morfológica (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Esta classificação é realizada em função do estágio de desenvolvimento e da qualidade morfológica, e a avaliação final da eficiência do processo superovulatório e a definição do destino dos embriões, que era a transferência direta, congelação ou descarte, devendo levar em consideração estes dois parâmetros. Nessa avaliação são consideradas características associadas a progressão do desenvolvimento embrionário, como número, tamanho, grau de compactação dos blastômeros, formação da blastocèle, espaço ocupado pelo embrião e espessura da zona pelúcida. Para cada dia após a ovulação, é esperado um determinado estágio de desenvolvimento (VIANA, 2012).

A classificação do estágio de desenvolvimento da IETS usa códigos numéricos que vão de 1 até 9. A classificação da qualidade dos embriões usa códigos que vão de 1, onde os embriões são de qualidade excelente ou boa, até 4, onde são embriões mortos ou degenerados.

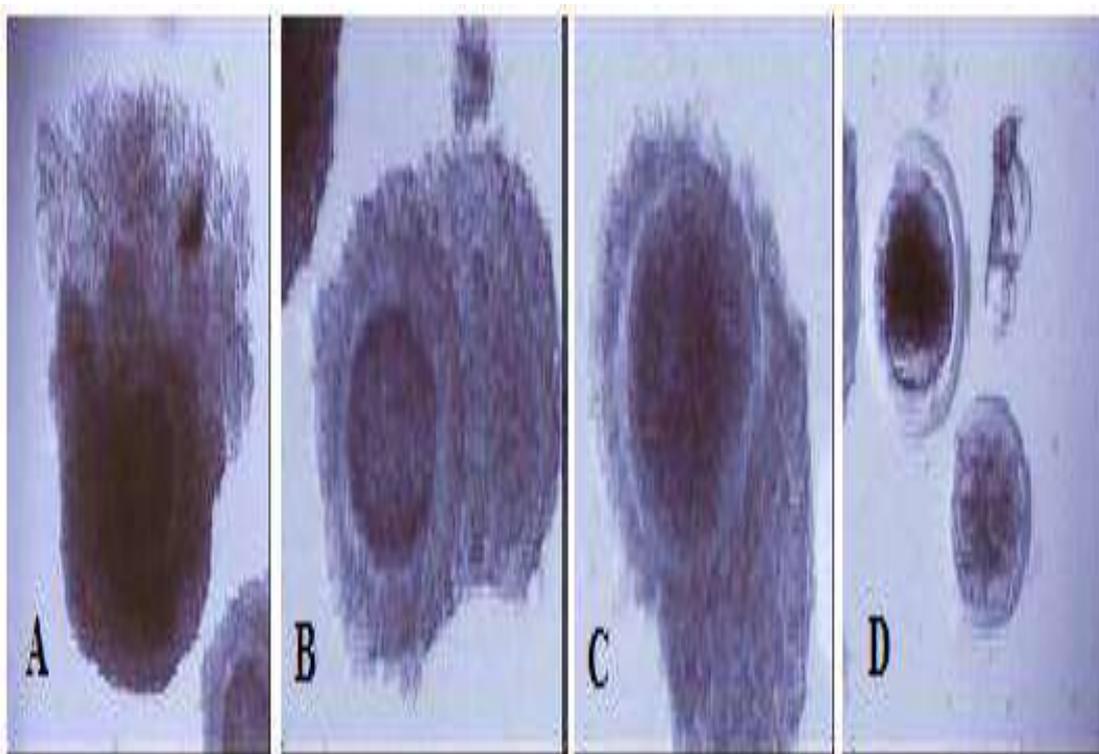
Na avaliação individual dos embriões, são várias as características a serem observadas, tais como: tamanho, forma, cor, homogeneidade do citoplasma, forma e integridade da membrana pelúcida, tamanho e presença de células no espaço perivitelínico e presença de vesículas (BEM *et al.*, 1995).

Segundo a IETS, os embriões são classificados em 4 graus:

- GRAU 1 (Excelente ou Bom): Estágio de desenvolvimento correspondente ao esperado; massa embrionária simétrica e esférica com blastômeros individuais que são uniformes em tamanho, cor e densidade; forma regular, a zona pelúcida não deve apresentar superfície côncava ou plana, deve ser lisa e, preferencialmente intacta, menos de 15% de células extrusadas (Figura 5A).
- GRAU 2 (Regular): Estágio de desenvolvimento correspondente ao esperado; forma regular, zona pelúcida intacta ou não, irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho; pelo

menos de 50% das células compõem massa embrionária viável; menos de 15% de células extrusadas (Figura 5B).

- GRAU 3 (Pobre): Estágio de desenvolvimento não corresponde ao esperado; irregularidades maiores na forma geral da massa embrionária ou no tamanho; menos de 75% das células degeneradas; pelo menos 25% das células compõem massa embrionária viável (Figura 5C)
- GRAU 4 (Morto ou Degenerado): Estágio de desenvolvimento não corresponde ao esperado, embrião em degeneração; massa embrionária de menos de 25% de todo o material celular presente no interior da zona pelúcida (Figura 5D)



**Figura 5.** Classificação dos embriões quanto à qualidade.

Fonte: 82ª SEMANA DO FAZENDEIRO, 2011.

### 2.3. Transferência de Embrião (Inovulação)

Na transferência de embriões, somente embriões classificados em grau 1 a 3 serão transferidos nas receptoras avaliadas e protocoladas. Todos os embriões a serem transferidos serão acomodados em palhetas contendo o meio de cultivo e uma coluna de ar nas extremidades de cada lado separando a coluna central onde contém o embrião. As palhetas precisam ser devidamente identificadas para evitar equívocos no momento da transferência (REICHENBACH, H.D. *et al.*, 2008).

A transferência é por via transcervical, onde a receptora é palpada retalmente para determinar o ovário que contém o corpo lúteo. Posteriormente, por uma norma da empresa, a receptora é submetida a uma segunda avaliação por palpação retal com auxílio da ultrassonografia transretal onde eram avaliados os ovários em busca da presença de corpo lúteo e o mesmo era classificado (TABELA 1)

Essa classificação interna da empresa onde “D” é corpo lúteo no ovário direito e “E” é corpo lúteo no ovário esquerdo, o “1” significa um corpo lúteo excelente, “2” é um corpo lúteo muito bom, “3” é um corpo lúteo bom e “R” é um corpo lúteo regular, considerado reserva, ou seja, uma receptora que só será usada no caso de sobrar embriões. A classificação era uma forma de padronizar o estado em que a equipe encontrava as receptoras no ato de transferência e de uma forma de manter armazenados os dados de avaliação do plantel de receptoras.

**Tabela 1:** Classificação do corpo lúteo em ovários de vacas receptoras de embrião bovino.

Direito	Esquerdo
D1	E1
D2	E2
D3	E3
RD	RE

Após, realiza-se a analgesia epidural do animal, no espaço sacrococcígeo, para evitar a movimentação do animal durante o procedimento, ajustando-se a dose de acordo com o animal, lembrando que a raça Gir é mais sensível. O animal é higienizado ao redor da vulva, ânus e inserção da cauda, com água (SANTOS, 2011).

A transferência de embriões ocorre através da inovulação transcervical, no corno ipsilateral ao ovário que apresentava o corpo lúteo.

Sob condições assépticas, a palheta contendo o embrião era encaixada em um aplicador (inovulador) revestida por uma bainha estéril e uma camisinha sanitária, em seguida era introduzida via transcervical (na entrada da cérvix e rompe a camisa sanitária), e por manipulação retal era guiada até o corno uterino ipsilateral do corpo lúteo cíclico, onde finalmente o líquido contendo o embrião era depositado (JÁINUDEEN *et al.*, 2004).

Concluído essa parte, após 30 dias da TE, o veterinário da empresa retorna a fazenda novamente para a realização da confirmação de prenhez dos animais que participaram do protocolo. Caso alguns animais não estivessem prenhez, eram submetidos ao protocolo novamente, realizando-se a resincronização. Essa confirmação de prenhez era realizada com o auxílio do ultrassom.

Por último, aos 60 dias de prenhez, comparecia-se novamente a propriedade para a realização da sexagem desses animais prenhez. Com a sexagem, o cliente poderá se programar melhor em caso de reposição e também agregar valor em seus animais caso sejam vendidos.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços obtidos nas biotécnicas reprodutivas ao longo dos anos permitiram uma maior participação da fêmea bovina no processo de melhoramento genético do rebanho. Isso porque o número de descendentes deixados por uma única fêmea ao longo de sua vida reprodutiva aumentou significativamente com a utilização das técnicas de transferência e produção *in vitro* de embriões. A PIVE ainda é uma biotecnologia pouco utilizada nas fazendas brasileiras, porém, em breve será muito utilizada de forma mais ampla, abrangendo mais nos rebanhos comerciais, gerando ganhos consideráveis ao produtor pelo melhor aproveitamento do potencial genético de seus animais em curto espaço de tempo, além dos avanços de grande relevância que a aplicação dessa biotecnologia gera para a área da pesquisa.

O estágio curricular supervisionado foi uma ótima oportunidade para adaptar o conhecimento adquirido na vida acadêmica com a prática. A troca de conhecimentos com os profissionais da área foi de suma importância para o enriquecimento da minha vida profissional. O estágio possibilitou aprimoramento dos conhecimentos a cerca da área de reprodução, assim como sua importância, perfazendo, um dos pilares primordiais para o sucesso das propriedades rurais. Para o sucesso profissional nessa área exige-se uma constante atualização e muita leitura.

Após um bom estágio curricular, o aluno de graduação terá uma boa base a respeito da realidade do trabalho profissional e saberá, assim, como se adaptar às exigências do mercado de trabalho.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

ALVAREZ, R.H. **Dez questões sobre transferência de embriões em bovinos: o papel das recptoras.** *Pesquisa e Tecnologia*. São Paulo, v. 6, n.2, nov. 2009.

ANDRADE, J. C. O.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F. **Use Seroid Hormone Treatments Prior to Superovulation in Nelore Donors.** *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v.69, n.1-2, p.9-14, 2002.

BEEFPOIT. **IBGE: rebanho de bovinos tinha 218,23 milhões de cabeças em 2016.** Disponível em: <[www.beefpoit.com.br/ibge-rebanho](http://www.beefpoit.com.br/ibge-rebanho)>. Acesso em 06 nov. 2017.

BEM, A. R.; RUMPF, R.; SOUSA, R. V.; PEIXER, M. A. S. **Manual Sobre Transferência e Micromanipulação de Embriões nas Espécies Bovina e Equina.** Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995.

BIOEMBRYO-BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO. **Passo a Passo da Produção *In Vitro* de Embriões Bovinos.** Disponível em <[www.bioembryo.com.br/noticias](http://www.bioembryo.com.br/noticias)>. Acesso em 13 nov. 2017.

GARCIA, J. M., AVELINO, K. B., VANTINI, R. **Estado da Arte da Fertilização *In Vitro* em Bovinos.** Evento: 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, p 223-230, 2012.

GONÇALVES, P.B.D et al.; **Produção *in vitro* de Embriões.** IN: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. C. 2 ed. São Paulo: Roca, p. 263-264, 2008.

JÁINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Indução da Ovulação, Produção e Transferência de Embriões.** IN: HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B; 7 ed. Barueri, SP: Manole, p 429-430, 2004.

FILHO, JURANDY MAURO PENITENTE. **Produção de Embriões bovinos *IN VIVO E IN VITRO***, 82ª Semana do Fazendeiro, Viçosa: MG, 2011.

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: 24 jan. 2017.

OLIVEIRA, C. S.; SARAPIÃO, R. V.; QUINTÃO, C. C. R. **Biotécnicas da Reprodução em Bovinos**. Evento: 3º Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em Bovinos”, Embrapa Gado de Leite. Documento 175, p 42, 2014

REICHENBACH, H.D. et al.; **Transferência e Criopreservação de Embriões Bovinos**. IN: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. C. 2 ed. São Paulo: Roca, p. 201-216-217-218-227, 2008.

RENESTO, A. 2004. **Associação das Biotécnicas: Aspiração Folicular Guiada por Ultra-Sonografia e Superovulação na Produção *In Vitro* e *In Vivo* de Embriões Bovinos**. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)- Universidade Estadual de São Paulo- UNESP, Jaboticabal, 59f.

RUFINO, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. **Determinação do Sexo de Embriões Bovinos Produzidos *In Vitro*: uma Revisão de Métodos com Ênfase para a PCR**. Archives of Veterinary Science, v.11, p.1-7, 2006.

SANTOS, G. M. **Curso de Transferência de Embriões em Bovinos**. CPT Cursos Presenciais. Apostila. 2011.

SCARPELLI, L. C. **Sincronização do ciclo estral em bovinos**. São Paulo: Pharmacia Saúde Animal, 2003.

SENEDA, MACEDO, **Aspiração Folicular *in vivo*: Metodologia, Eficiência e Sequelas**, Disponível em <[www.bioembryo.com.br/noticias](http://www.bioembryo.com.br/noticias)> Acesso em 06 nov. 2017.

VALENTIM, R.; GOFERT, L. **Conceitos sobre sincronização de receptoras**. 06, fev, 2004. Disponível em [http: <http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/reproducao/conceitos-sobre-sincronizacao-de-receptoras-17964/>](http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/reproducao/conceitos-sobre-sincronizacao-de-receptoras-17964/).

Acesso em 05 nov. 2012.

VALLE, E. R; ANDREOTTI, R; THIAGO, L. R. L. S. **Técnicas de manejo reprodutivo em bovinos de corte**. Embrapa gado de corte. Campo Grande. p.61, 2000.

WILLIAMS, G. L. **Implicações de Amamentação e Manejo de Cria na Eficiência Reprodutiva Futura de Vacas de Corte**. In: V CURSO NOVOS ENFOQUES NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 2001. Uberlândia. *Anais...* Uberlândia, 2001. p 65.

YAMAZAKI, WALT. **Aspectos Técnicos e Comerciais da FIV**. Disponível em: [<www.bioembryo.com.br/noticias>](http://www.bioembryo.com.br/noticias). Acesso em 14 nov. 2017.