

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA**

MARCO ANTONIO MENINE VIELMO

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Área de concentração: Biotecnologia da Reprodução em
Bovinos**

**Uruguaiana
2019**

MARCO ANTONIO MENINE VIELMO

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório do Estágio Curricular
Supervisionado em Medicina Veterinária
da Universidade Federal do Pampa,
apresentado como requisito parcial para
obtenção do Título de Bacharel em
Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita

**Uruguaiiana
2019**

MARCO ANTONIO MENINE VIELMO

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório do Estágio Curricular
Supervisionado em Medicina Veterinária
da Universidade Federal do Pampa,
apresentado como requisito parcial para
obtenção do Título de Bacharel em
Medicina Veterinária.

Relatório defendido e aprovado em 24, junho de 2019.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita
Orientador
UNIPAMPA

Prof. Dra. Francielli Weber Santos Cibir
UNIPAMPA

Prof. Dr. Fabricio Desconsi Mozzaquatro
UNIPAMPA

Dedico esta conquista aos meus pais, Antonio Luiz e Marta Vielmo, meus maiores exemplos e que sempre acreditaram e contribuíram para que eu concluísse esse sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar forças para seguir em frente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais Antonio Luiz Vielmo e Marta Regina Menine Vielmo, por tornar esse sonho uma realidade, sem o apoio de vocês não teria conseguido concluir esta etapa. Agradeço por estarem sempre do meu lado pelo incentivo, amor e carinho.

As minhas irmãs Karoline e Karine por me apoiarem, com conselhos e carinho durante momentos difíceis desta trajetória.

A minha sobrinha Manoela, veio para unir nossa família, e trazer alegria diariamente.

Ao meu cunhado Sidnei Vielmo Sacardi, por toda amizade e conselhos, onde se fez presente em toda minha caminhada.

Ao meu primo Francis Vielmo Pilar, pela sua irmandade e parceria, onde em muitas vezes deixou a São Rafael de portas abertas para eu pôr em prática meu conhecimento.

A todos colegas e amigos que fiz durante a graduação, especialmente os da XI turma pelas parcerias, tragos, churrascos e por tornar essa caminhada menos árdua.

Agradeço ao professor Tiago Gallina Correa, obrigado pelo carinho, atenção, conselhos, puxões de orelha e pelas inúmeras oportunidades que tive de aprender algo contigo. Meu muito obrigado.

Ao professor Fernando Mesquita, o qual sempre esteve a disposição para conversar e tirar dúvidas, me auxiliando durante o período final da graduação e estágio final.

Ao professor Mateus Sudano pela amizade, e ensinamentos e aprendizados que tive contigo durante o tempo que fui teu orientado.

Ao laboratório de biotecnologia da reprodução da UNIPAMPA (BIOTECH) muito obrigado pelo acolhimento e ensinamentos, onde foi possível que eu conhecesse melhor as biotecnologias e me apaixonar ainda mais pela reprodução animal.

Ao pessoal da ABS PECPLAN de Mogi Mirim, por todo empenho, paciência, dedicação e ensinamentos. Agradeço a cada um dos profissionais que tive a oportunidade de acompanhar e pela amizade construída.

Agradeço aos diversos professores do curso de Medicina Veterinária, vocês são responsáveis por grande parte do conhecimento que possuo hoje. Muito obrigado por esses cinco anos de convivência, amizade e aprendizado.

Trace uma meta em sua vida, e persiga-a constantemente, não permita com que nada tire o seu foco, com que nada te impeça de alcançar.

Leticia Ayala

RESUMO

Este relatório descreve as principais atividades acompanhadas/realizadas em Medicina Veterinária, na área de concentração em Biotecnologias da Reprodução aplicadas em bovinos. Dentre elas podemos citar a aspiração folicular (*ovum pick up*), produção *in vitro* e transferência de embriões, ultrassonografia aplicada a bovinos, diagnóstico de gestação, sexagem fetal e protocolos de sincronização de estro. Optou-se pela empresa ABS PECPLAN como local de estágio, a qual possui grande relevância no cenário nacional na produção de embriões *in vitro*, pela sua eficiência e qualidade de serviços prestados no setor de biotecnologia. A empresa está localizada na cidade de Mogi Mirim no estado de São Paulo, e atende diversas propriedades em inúmeras regiões do país e também no exterior. O estágio curricular foi realizado sob a supervisão do Médico Veterinário Tomas Augusto Nunes Pinheiro De Souza Reis e orientação do Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita, entre os dias de 14 de janeiro de 2019 a 03 de maio de 2019 somando um total de 600 horas.

Palavras-Chave: Biotecnologia da reprodução, produção *in vitro*, transferência de embriões.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Localização territorial da empresa na cidade Mogi Mirim estado de São Paulo.....	13
(Figura 2 – A) Vacas nelores receptoras Katayama Alimentos S/A em Três Lagoas - MS. B) Receptoras Brangus - Agropecuária JMT São Gabriel – RS.....	18
Figura 3 – Protocolo de sincronização padrão utilizado pela empresa.....	19
Figura 4 – Taxa de prenhez por categoria embriões a fresco e vitrificados, dados da empresa ABS PECPLAN.....	22
Figura 5 – Taxa de prenhez conforme avaliação e tamanho do CL de receptoras de embrião.....	23
Figura 6 – Taxa de prenhez de receptoras conforme escore de condição corporal (escala de 1 a 5 dados da empresa ABS PECPLAN.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividades desenvolvidas e/ou acompanhadas, durante a realização do estágio curricular supervisionado em Medicina Veterinária.....	14
Tabela 2 – Classificação oocitária conforme graus de qualidade.....	16
Tabela 3 – Classificação de CL durante avaliação de receptoras de embrião.....	20
Tabela 4 – Média de oócitos recuperados por sessão de OPU conforme a subespécie.....	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	13
2.1 ABS PECPLAN.....	13
2.2 Atividades relacionadas a biotecnologias reprodutivas.....	14
2.3 Seleção das doadoras.....	14
2.4 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia - OPU	15
2.5 Seleção de receptoras	17
2.6 Sincronização de estro	18
2.7 Inovulação de embriões.....	19
2.8 Diagnóstico de Gestação.....	21
2.9 Diagnóstico de Gestação Final e Sexagem Fetal	21
2.10 Dados obtidos pela ABS PECPLAN.....	22
3 DISCUSSÃO	24
3.1 Fatores ligados a doadoras que influenciam a produção de embriões	24
3.1.1 Nutrição.....	25
3.1.2 Idade e categoria.....	25
3.1.3 Subespécie.....	26
3.1.4 Fase do ciclo estral	27
3.2 Fatores que afetam a eficiência reprodutiva de receptoras de embrião	27
3.2.1 Nutrição	28
3.2.2 Sincronização de estro em protocolos de TETF.....	28
3.2.3 Corpo lúteo.....	30
3.2.4 Inovulação	31
3.2.5 Transferência de embriões a fresco e criopreservados.....	32
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
REFERÊNCIAS.....	35
ANEXO I.....	41

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um dos pilares da economia brasileira, gerando emprego e renda a milhares de trabalhadores, com movimento estimado em mais de R\$523,25 bilhões, e geração de cerca de 353.725 novos empregos no ano de 2017 (BEEF POINT, 2018). O Brasil possui 214,9 milhões de bovinos, sendo o segundo país em tamanho de rebanho e produção de carne mundial, gerando 11 milhões de toneladas de carne bovina (ABIEC, 2019). Segundo Saud (2018) o Brasil tem cerca de 83 milhões de fêmeas aptas à reprodução, sendo que dentro deste universo, 57 milhões compõem o rebanho de corte e outras 26 milhões o rebanho leiteiro. Neste contexto, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem evoluído significativamente e alcançado destaque mundial nos anos recentes. No ano de 2017, 345.528 mil embriões PIVE foram produzidos, ficando apenas atrás da produção dos Estados Unidos, depois de anos de supremacia brasileira neste setor (VIANA, 2018).

Ao observar este cenário as biotecnologias da reprodução aparecem como alternativa para promover melhores resultados no setor da bovinocultura, visto que o mercado está cada vez mais exigente quanto à precocidade, qualidade de carne e maior produção leiteira. As ferramentas de biotecnologia de maior utilização são a inseminação artificial, a transferência de embriões e a produção *in vitro* de embriões. A PIVE apresenta algumas vantagens que favorecem a sua utilização, dentre elas: proporciona determinação e controle do sexo; otimiza o efeito materno nos descendentes, rápida multiplicação de planteis, proporciona o comércio de material genético da fêmea, formação de estoques de embriões congelados; otimização do sêmen de alto valor genético (GONÇALVES, et al., 2007)

Ao decorrer deste relatório serão apresentadas as atividades acompanhadas/realizadas durante o estágio curricular na empresa ABS PECPLAN. A escolha do local de estágio deve-se ao fato de a empresa ser considerada referência nacional e internacional na área de produção de embriões bovinos *in vitro*. O estágio curricular supervisionado em medicina veterinária (ECSMV) tem como objetivo a consolidação dos conhecimentos do discente obtidos durante a graduação nas biotécnicas reprodutivas.

2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

2.1 ABS PECPLAN

O ECSMV foi realizado na empresa ABS PECPLAN que desenvolve atividades em diversas regiões do país, prestando serviços na área de biotecnologias reprodutivas em bovinos, mais precisamente em produção *in vitro* de embriões. O estágio foi realizado na filial da empresa, em Mogi Mirim, estado de São Paulo - SP (Figura 01). As atividades iniciaram no dia 14 de janeiro de 2019 com término no dia 03 de maio do mesmo ano, sob a supervisão do médico veterinário Tomas de Souza Reis e a orientação do Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita, totalizando uma carga horária total de 600 horas.

A equipe da empresa era composta por 17 médicos veterinários de campo, sendo que 7 realizavam as aspirações foliculares e 10 as transferências de embriões. A empresa possui uma estrutura física composta por: sala de botijões, laboratório de produção *in vitro*, sala administrativa, sala de logística e sala de equipamentos onde cada médico veterinário armazena seu equipamento individual. Ainda, a empresa possui uma frota de 10 automóveis para realização da logística e prestação de serviço.

Figura 1– Localização territorial da empresa na cidade Mogi Mirim estado de São Paulo.



Fonte: Google Maps e Wikipedia.

2.2 Atividades relacionadas a biotecnologias reprodutivas

Durante o período de estágio foi possível acompanhar/desempenhar atividades relacionadas às biotécnicas reprodutivas aplicadas em bovinos, como a OPU (*ovum pick up*), seleção de doadoras e receptoras de ovócito e embriões, ultrassonografia na avaliação de doadoras e receptoras, diagnóstico de gestação e sexagem fetal. As atividades estavam ligadas à rotina da empresa ABS PECPLAN, e foram realizadas pelo quadro de médicos veterinários (Tabela 1).

Tabela 1 – Atividades acompanhadas e /ou desenvolvidas durante a realização do estágio curricular supervisionado em Medicina Veterinária.

Atividades	Número de Atividades	%
Inovulação de Embriões	665	30,84%
Diagnóstico de Gestação	565	26,21%
Aspiração Folicular Guiada por Ultrassom	436	20,20%
Protocolo de Sincronização de Estro	249	11,55%
Sexagem Fetal	241	11,18%
Total	2156	100%

Fonte: o autor

2.3 Seleção das doadoras

As vacas selecionadas como doadoras, de modo geral, eram determinadas pelo proprietário ou por técnicos responsáveis pela fazenda. Como critérios para seleção eram utilizados: mérito genético, características zootécnicas aptidões carniceras e leiteiras, progênie, também por seu valor monetário agregado e premiações.

Os médicos veterinários da empresa realizavam uma avaliação, através da condição corporal, onde se preconizava fêmeas com escore 3 em uma escala de 1 a 5 (1 - animal magro e 5 - animal gordo). No levantamento do histórico sanitário da propriedade era questionado se havia ocorrência de enfermidades

infectocontagiosas, dentre elas Brucelose, Leptospirose, Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), Diarreia viral bovina (BVDV) que interferem em um programa de PIVE. Era indagado sobre aspirações anteriores e um histórico reprodutivo prévio. O exame era realizado por palpação transretal com o auxílio de ultrassom e avaliava-se a saúde reprodutiva, descartando animais com patologias ovarianas, aderências e com mais de 90 dias de gestação, os quais não eram aspirados.

2.4 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia - OPU

A aspiração folicular guiada por ultrassom ou *ovum pick up* - OPU é uma técnica que obtém os gametas femininos de doadoras de forma minimamente invasiva. Previamente à saída para o local da aspiração, os médicos veterinários, juntamente a um técnico selecionador de oócitos, reuniam-se na empresa para realizar o *checklist* dos equipamentos e reagentes necessários à atividade. O deslocamento até o local onde a atividade seria realizada era feito através da frota da empresa, ou nos casos de aspirações em outros estados ocorria por meio aéreo. O laboratório da empresa era responsável pela produção dos meios de transporte oocitário. Os tubos eram preparados conforme o número de vacas, subespécie e categoria, além disso, era protocolo da empresa não armazenar mais de 50 oócitos por criotubo.

Na propriedade, os animais eram contidos em troncos de contenção para a realização da tricotomia mais antisepsia com álcool 70% na região da anestesia epidural. A anestesia epidural era a base cloridrato de lidocaína mais xilazina (Bloc®, J.A. Saúde Animal) por meio de injeção no espaço sacrococcígeo, entre S5-Co1 ou Co1-Co2. A dose era calculada conforme a relação de 1 ml para cada 100 kg de peso vivo, atingindo as doses de 0,2 mg/kg de Lidocaína e 0,004 mg/kg de Xilazina. Em função da sensibilidade à combinação farmacológica, animais da raça Gir tinham a dose ajustada 1 ml a cada 200 kg/PV. A anestesia epidural tem o objetivo de evitar desconforto do animal e movimentos peristálticos que dificultam o processo de aspiração.

O equipamento para aspiração era constituído por um aparelho de ultrassom (Mindray, DP2200) com guia de aspiração acoplada a um transdutor setorial convexo de 5,0 MHz. Na porção superior da guia localizava-se o mandril acoplado a um cateter 18 G, conectado a uma bomba de vácuo com pressão de 70 mmHg de

mercúrio (WTA, Brasil). Os oócitos recuperados eram transportados por um sistema de OPU (1,20 m – WTA, Brasil), e armazenados em tubos 50 ml (Falcon, - EUA) previamente aquecidos a 36°C contendo 5 ml de solução DPBS. Ficava a critério de cada selecionador a adição ou não de heparina.

Após a guia estar montada, era inserida uma camisinha sanitária envolvendo-a para evitar disseminação de enfermidades e contaminação do aspirado. O procedimento consistia na limpeza da região do períneo com água ou papel toalha, a guia era inserida na vagina até o fundo de saco, enquanto a outra mão era introduzida via retal para manipulação do ovário. Os ovários eram posicionados de acordo com linha de orientação demarcada por ultrassonografia, facilitando a visualização e punção dos folículos. Em posição superior cranial, o mandril era manipulado realizando a perfuração do saco vaginal em uma pressão contínua a vácuo, onde os folículos ≥ 2 mm eram puncionados. Após o término da aspiração folicular os tubos Falcon eram identificados com raça, categoria, prenhez, lactação, registro (RGD) e previsão de folículos aspirado da doadora, sendo posteriormente levados até o laboratório de campo para a seleção e rastreamento do conteúdo.

O líquido folicular oriundo da aspiração era depositado em filtro com capacidade de 150 ml, composto por tela de nylon 75 micras. A lavagem do filtro era realizada com DPBS para remoção de coágulos e debris celular. Após, o material retido era depositado em uma placa de Petri 90 mm (por doadora). Preconizava-se a troca dos filtros a cada cinco animais. Para a visualização das estruturas utilizava-se um estereomicroscópio com aumento de 50x. Os oócitos eram classificados de acordo com seu citoplasma e o número de camadas das células do *cumulus*, conforme (Tabela 2).

Tabela 2 – Classificação oocitária conforme graus de qualidade

Classificação dos CCOs	Células do <i>Cumulus</i>	Citoplasma
GI (Grau I)	> 3 camadas compactas	Homogêneo
GII (Grau II)	3 camadas compactas	Levemente heterogêneo
GIII (Grau III) ou parcialmente desnudo	3 camadas remoção de menos 1/3	-
Desnudo ou degenerado	Sem céls. Na região da ZP	Retração e vacuolização
Cumulus expandido ou atrésico	Expansão	-

Fonte: Adaptado (Viana et.al.,2004)

Após a classificação, os oócitos eram lavados em quatro gotas, as três primeiras lavagens eram realizadas em gotas contendo meio MIV + meio LAV (lavagem), e a quarta gota contendo somente meio MIV. A maturação iniciava-se durante o transporte, quando os oócitos eram armazenados em criotubos gaseificados com controle de atmosfera gasosa. A concentração de gases era de 5% de CO_2 , 5% de O_2 e 90% de N_2 . Os tubos continham 400 μ l de meio de maturação (MIV) cobertos por 300 μ L de óleo mineral e eram remetidos ao laboratório em uma transportadora de oócitos (TO) a 38,5°C. Ao chegar ao laboratório os criotubos eram armazenados em uma incubadora com controle de temperatura e atmosfera gasosa até completar 24 horas de maturação, para iniciar o procedimento de FIV.

2.5 Seleção de receptoras

A seleção das fêmeas como receptoras de embrião é uma parte do processo de PIVE de extrema importância, pois estes animais irão gestar embriões de grande valor genético e comercial (Figura 2). Os médicos veterinários realizavam exames ginecológicos para avaliação de ciclicidade, avaliação da condição corporal, questionavam sobre a utilização de vacinas contra enfermidades reprodutivas e sobre o fornecimento de suplementação mineral. Durante a avaliação do escore de condição corporal era utilizada uma escala de 1 a 5 (1 - animal magro e 5 - animal gordo), considerando-se o escore 3 adequado. O exame ultrassonográfico avaliava as fêmeas através de contratilidade uterina e presença de corpo lúteo (CL). O objetivo era a utilização de fêmeas que estivessem cíclicas em função de uma melhor resposta ao protocolo de sincronização

Figura 2 – A) Vacas nelores receptoras Katayama Alimentos S/A em Três Lagoas - MS. B) Receptoras Brangus - Agropecuária JMT São Gabriel – RS



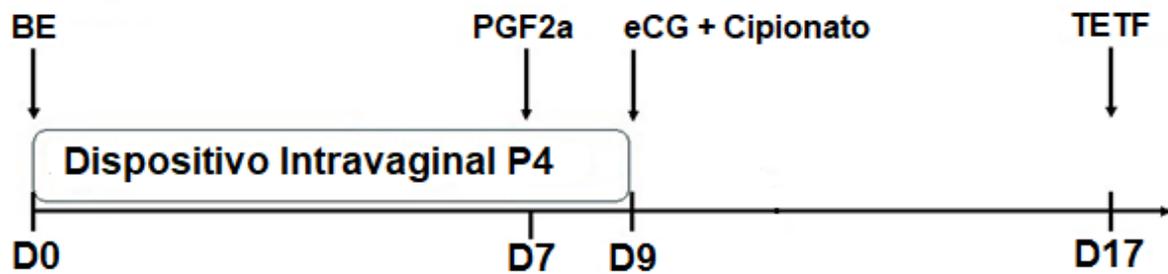
Fonte: o autor

2.6 Sincronização de estro

Os animais a serem sincronizados durante o estágio passavam por uma avaliação prévia, onde realizava-se avaliação do escore de condição corporal e exame de ciclicidade através de palpação retal ou auxiliado por ultrassom. O exame consistia em diagnosticar vacas ou novilhas que apresentavam corpo lúteo, folículo em dominância e contratilidade uterina. Após exame as fêmeas eram classificadas em cíclicas, anestro superficial ou anestro profundo. A sincronização era realizada somente em fêmeas que apresentassem morfologia cervical retilínea, presença de CL, ou naquelas em anestro superficial com presença de contratilidade uterina. As fêmeas que não contemplassem estes critérios não eram sincronizadas.

O protocolo padrão era à base de progesterona e estradiol, consistindo na inserção de implante de progesterona (P4) de liberação lenta de 1,9 g ou 1 g dia zero (D0), seguido de aplicação IM de 2 mg de benzoato de estradiol (BE). Nos dias D7 e D9 o proprietário era responsável pela aplicação dos hormônios para o protocolo de sincronização. No D7 era realizada uma aplicação do análogo de prostaglandina, d-clospostenol, e no dia D9 retirava-se o implante de progesterona, administrava-se 1 mg de cipionato de estradiol e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG). No 17º dia do protocolo realizava-se a TETF (transferência embriões em tempo fixo)

Figura 3 – Protocolo de sincronização padrão utilizado pela empresa.



Fonte: o autor

2.7 Inovação de embriões

A transferência de embriões a fresco dependia das particularidades e escolha de cada propriedade, sendo também influenciada por sua distância do laboratório. Os embriões eram avaliados conforme sua qualidade e fase de desenvolvimento. Visando a inovação era preconizada a utilização dos estádios de blastocistos (BL), mas também eram envasados Blastocisto Expandido (Bx) e Blastocisto em eclosão (Bn), para posterior transferência em receptoras. O transporte era realizado por meio de uma transportadora de embriões (Micro Q®) com temperatura de 36°C. Os embriões poderiam também ser transportados em diferentes fases de desenvolvimento, sendo armazenados em criotubos nas diferentes fases de cultivo embrionário: D4, D5, D6. Nestes casos em que o desenvolvimento embrionário deveria ser mantido até a chegada à propriedade, o transporte era realizado em uma transportadora de oócitos com temperatura controlada de 38,5C°. Um funcionário do laboratório era designado para efetuar a classificação de qualidade, envase e ocasionalmente a vitrificação dos embriões excedentes.

A criopreservação possibilita estocar esses embriões, por tempo indeterminado em nitrogênio líquido. Uma vantagem desta técnica é quando há uma grande produção de embriões e uma falta de receptoras sincronizadas, viabilizando o acondicionar esses embriões excedentes para posterior transferência. A empresa utiliza, principalmente, dois métodos de criopreservação; a vitrificação e o congelamento lento. A utilização das técnicas dependia da logística, ou a forma que os embriões eram comercializados.

O processo de vitrificação consiste em uma técnica de criopreservação, através da qual os embriões são expostos a meio que contem grande viscosidade

até ser atingido o estágio vítreo. As estruturas já vitrificadas eram aquecidas, avaliadas quanto à qualidade, e envasadas. O laboratorista identificava os lacradores conforme a ordem de aquecimento, onde seriam transportados através de uma transportadora Micro Q® com temperatura de 36°C.

O procedimento pelo método *direct transfer* difere dos demais. Para a técnica eram utilizados somente embriões grau I em estágio de blastocisto expandido (BX). Os embriões eram envasados em palhetas de 0,5 ml contendo identificação do acasalamento e dados do congelamento. O congelamento era realizado pela técnica de congelamento lento, a técnica ocorre através de uma curva lenta e negativa de temperatura. O descongelamento era realizado utilizando um descongelador portátil à temperatura de 36°C. Removia-se a palheta contendo o embrião mantendo-a por 10 segundos em temperatura ambiente e 30 segundos submersa no descongelador. A palheta era retirada e seca com papel toalha. O meio contendo o embrião era homogeneizado antes de acoplar a palheta ao inovulador.

As receptoras eram avaliadas através de palpação transretal, ou por ultrassonografia para verificar a resposta dos animais ao protocolo de sincronização. Os animais cíclicos eram classificados conforme seu corpo lúteo CL 1 (ruim) 2 (regular) 3 (bom) conforme (Tabela 3). Os que não respondiam o seu destino era determinado pelo proprietário.

Tabela 3 – Classificação de CL durante avaliação de receptoras de embrião

Classificação dos CL	Avaliação Palpação Retal	Imagem Ultrassonográfica
SEM CL	Não detectado	Não visualizado
CL 1 Ruim	Leve Proeminência	Pequena estrutura
CL 2 Regular	Discreta Proeminência	Branda estrutura
CL 3 Bom	Abundante Proeminência	Grande estrutura

Fonte: o autor

O ato de inovulação era realizado 17 dias após o início do protocolo de sincronização. A técnica consistia em: contenção da receptora, e anestesia epidural por meio de injeção de cloridrato de lidocaína mais Xilazina (Bloc®, J.A, Saúde Animal) no espaço sacrococcígeo. Em todos os métodos a palheta contendo o embrião era acoplada a um inovulador revestido por uma bainha e camisa sanitária,

o qual era introduzido via transcervical. O inovulador era guiado por palpação transretal até o anel cervical, momento em que a camisa sanitária era rompida, transpassava-se a cérvix e realizava-se a inovulação no corno uterino ipsilateral na porção do terço médio.

2.8 Diagnóstico de Gestação

O diagnóstico de gestação era realizado em momento precoce, após 23 dias da inovulação dos embriões, através da palpação retal auxiliada por ultrassonografia. O profissional responsável introduzia via transretal um transdutor retal linear, e realizava uma varredura em ambos os cornos uterinos para identificação da presença de líquido amniótico e vesícula embrionária. Quando da não confirmação da prenhez, realizava-se a avaliação dos ovários para verificação da ciclicidade.

Em casos de ausência de gestação, algumas propriedades realizavam o exame ginecológico seguido por sincronização de estro visando a inclusão da fêmea em programa de TETF subsequente. Alternativamente, os animais eram retirados dos programas e/ou descartados, a critério de cada propriedade.

2.9 Diagnóstico de Gestação Final e Sexagem Fetal

Aos 53 dias após a inovulação dos embriões era realizado o diagnóstico confirmatório seguido por sexagem fetal, caracterizando a última etapa do processo de FIV acompanhada pela empresa. A sexagem fetal era realizada com o auxílio de ultrassonografia, visando à visualização do tubérculo genital a partir de imagens de obtidas de diferentes posições. Preconiza-se a realização da sexagem fetal até os 60 dias, uma vez que em estágios mais avançados de gestação a visualização das estruturas tornava-se dificultada. A técnica consistia em posicionar o transdutor sobre o feto visualizando a região abdominal e caudal. A presença do tubérculo na região ventral, próximo ao cordão umbilical, é sugestivo que o indivíduo do sexo masculino; já fêmeas eram identificadas quando o tubérculo se apresentava na região próxima a cauda, entre os membros pélvicos.

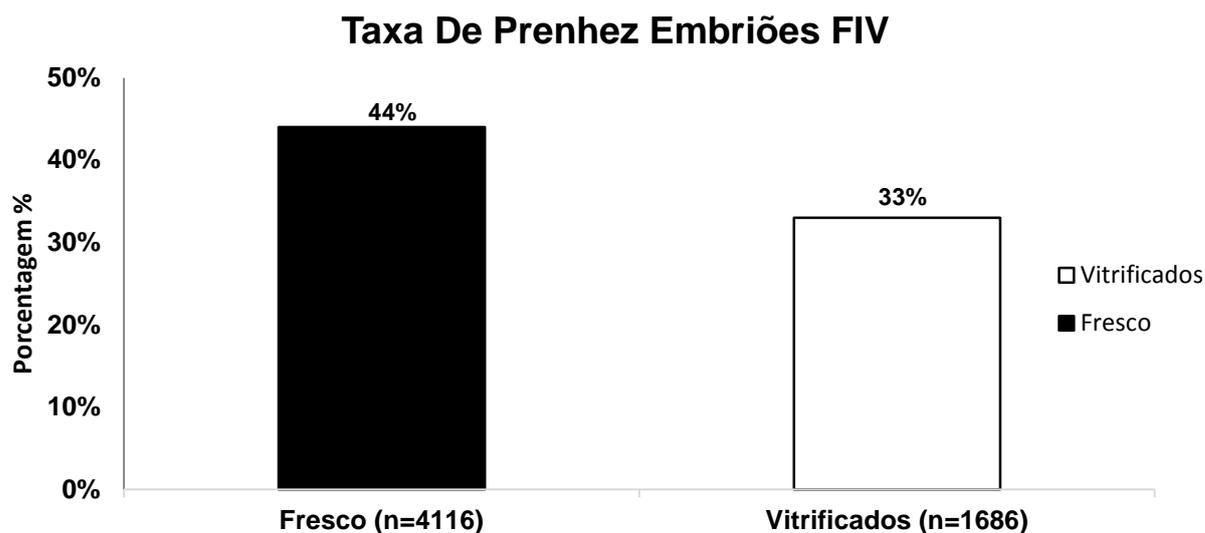
Após as etapas descritas anteriormente, os dados da quantidade de animais avaliados, aspirados, embriões inovulados e confirmações de prenhez eram tabulados e analisados. Eram elaborados relatórios, sendo uma via deste relatório

fornecida ao proprietário ou responsável e a outra era remetida à empresa, para fechamentos dos dados e devidas cobranças.

2.10 Dados obtidos pela ABS PECPLAN

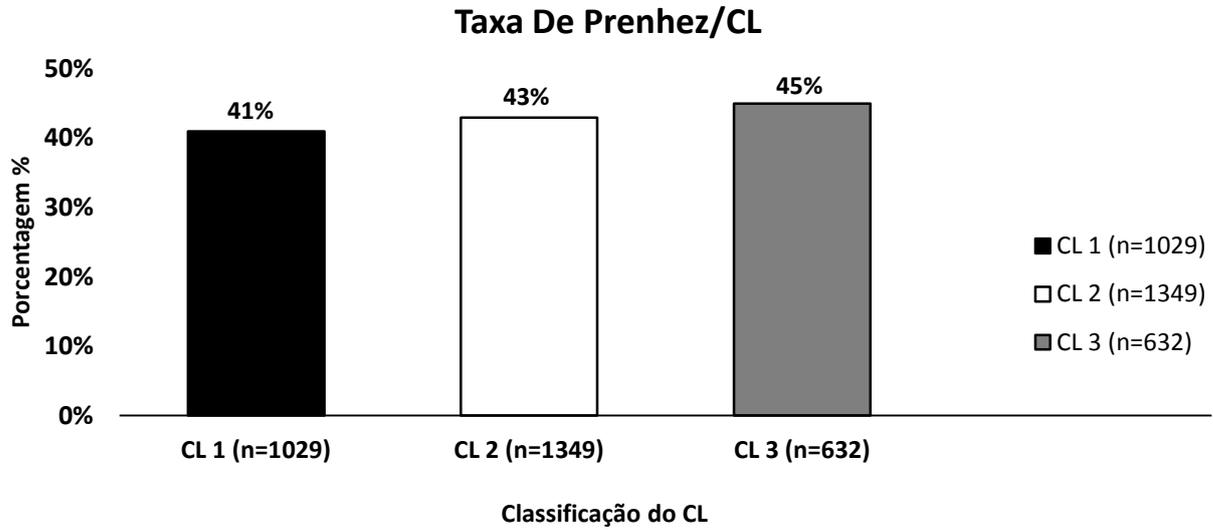
Os dados a seguir são de todos os procedimentos realizados pela empresa no ano de 2018. Estes são compilados através de uma parceria com a empresa Zoetis®, a qual é responsável pela realização de análise estatística e divulgação. Foram analisados os seguintes fatores: criopreservação (Figura 4), classificação de CL (Figura 5), escore de condição (Figura 6) e sua relação com taxas de prenhez. E a (Tabela 3) foram dados compilados pelo estagiário durante o período de estágio.

Figura 4 – Taxa de prenhez por categoria embriões a fresco e vitrificados, dados da empresa ABS PECPLAN.



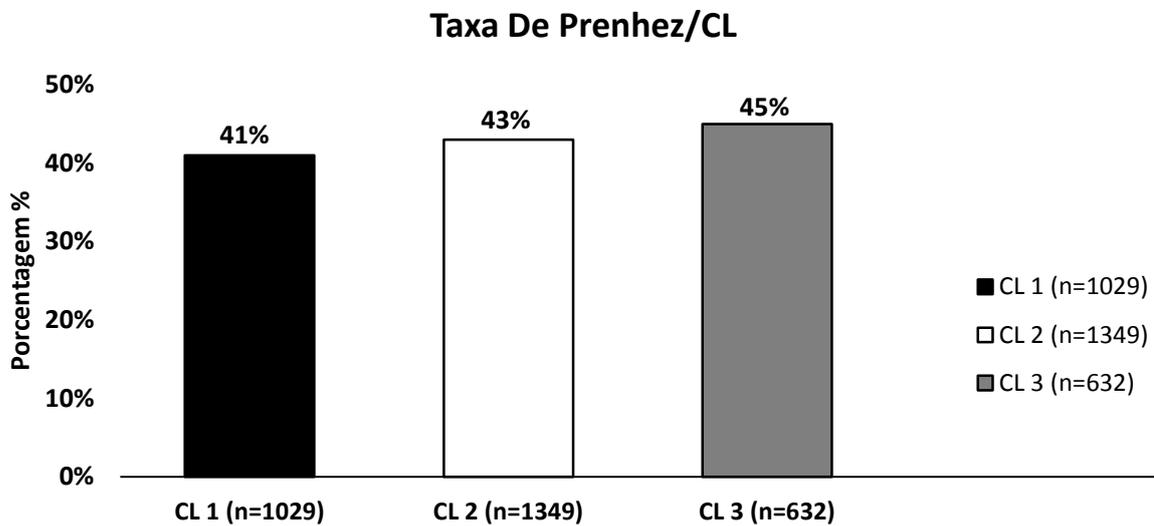
Fonte: o autor

Figura 5 – Taxa de prenhez conforme avaliação e tamanho do CL de receptoras de embrião



Fonte: o autor

Figura 6 – Taxa de prenhez de receptoras conforme escore de condição corporal (escala de 1 a 5 dados da empresa ABS PECPLAN)



Fonte: o autor

Tabela 3 – Média de oócitos recuperados por sessão de OPU conforme a subespécie.

Subespécie	Média Oócito/OPU
Bos indicus	
Brahman	40
Gir	25
Nelore	39
Bos taurus	
Brangus	25
Angus	21

Fonte: o autor

3 Discussão

Durante o ECSMV foram acompanhadas diversas atividades vinculadas a ao processo de produção de embriões *in vitro*. Foram escolhidos alguns fatores de maior influência nos procedimentos de aspiração folicular e transferência de embriões para a discussão. Foi denotado que durante o estágio estes assuntos abordados tiveram grande influência para o sucesso ou para entraves dos procedimentos acompanhados. Para melhor entendimento serão discutidos alguns dados obtidos pela empresa ABS PECPLAN e outros compilados pelo autor durante o tempo de estágio.

3.1 Fatores ligados a doadoras que influenciam a produção de embriões

A produção embriões no Brasil é uma técnica que vem sendo utilizada em larga escala, diminuindo o intervalo entre gerações e aumentando a eficiência reprodutiva. Porém, existem fatores relacionados a doadoras que influenciam o processo de PIVE. Entre eles, destaca-se idade, nutrição, fase do ciclo estral e genótipo (MELLO, et al., 2016). Os fatores de maior relevância serão discutidos e confrontados com a literatura nos procedimentos acompanhados/realizados durante o estágio.

3.1.1 Nutrição

Para a obtenção de bons resultados em sistemas de produção *in vitro* deve-se atentar para bom manejo das fêmeas doadoras de gametas. Dentre esses cuidados uma dieta adequadamente balanceada é importante, visto que o estado nutricional e metabólico tem grande influência na PIVE, pois afeta diretamente na secreção de hormônio ligados a reprodução, dinâmica folicular e qualidade oocitária (DISKIN et al.,2003)

A qualidade dos alimentos fornecidos a doadoras de embrião deve ser levado em consideração, pois dietas desbalanceadas e animais com excesso de peso não se obtém bons resultados na produção *in vitro*. Siddiqui et al., (2002) em seu experimento constatou que o excesso de escore de condição entre 2,5 - 3 obtiveram melhores resultados em comparação ao excesso de condição corporal entre 4 – 4,5. A subnutrição foi deletério ao procedimento, isto devido ao aumento da leptina o hormônio da saciedade o qual diminui a liberação do GNRH o influencia na secreção de hormônios produzidos pela hipófise anterior (DISKIN, et al.,2003)

Outro fator que não é muito relatado é a influência dos minerais na dieta. O selênio é um micromineral, quando adicionado à dieta de doadoras, promove maior quantidade de oócitos totais aspirados, embriões viáveis e produção embrionária (MORAES, et al., 2012). Este micromineral possui ação antioxidante auxiliando na formação dos oócitos e maturação dos folículos (CARVALHO et al., 2003).

Durante o estágio a empresa orientava os proprietários para um fornecimento de alimentos de boa qualidade e manter um escore de condição adequado 3 . A qualidade da dieta fornecida as doadoras está associadas a boas taxas de recuperação oocitária, interferindo diretamente em melhor produção embrionária.

3.1.2 Idade e categoria

A idade é um fator importante, pois o mercado está produzindo embriões de animais cada vez mais jovens. Isso possibilita diminuir o intervalo entre gerações e proporciona um aumento no ganho genético (LANDRY, et al., 2018). Segundo Baruselli et al., (2016) novilhas pré-púberes possuem baixas taxas de produção de blastocisto quando comparadas a púberes. Esta categoria possui menores taxas, visto que há baixa produção de hormônios reprodutivos, principalmente o hormônio

folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) (BERNAL, et al., 2011). Pode-se concluir que a competência oocitária é influenciada pela maturidade sexual da doadora (WARZYCH, et al., 2017). Su et al., (2012) utilizou em experimento fêmeas de três categorias diferentes: novilhas de 12 meses, vacas de meia idade 7 anos e vacas velhas de 15 anos. Verificou que vacas velhas possuem baixas taxas de produção embrionária. Isto ocorre pelo menor número de folículos disponível no ovário e menor quantidade de células do *cumulus* nos oócitos.

Vacas em lactação possuem baixa qualidade oocitária e menores taxas de produção embrionária. Swangchan-uthai et al., (2011) em seu trabalho constataram que novilhas possuem altas concentração de IGF I no oviduto na fase de estro. Em contrapartida, vacas em lactação possuem esse fator em pouca quantidade. Em outro experimento, novilhas e vacas em lactação da raça holandesa foram avaliadas quanto à produção de embriões, e as novilhas obtiveram maiores índices de embriões recuperados e taxa de embriões viáveis em relação às vacas (SARTORI et al., 2002).

3.1.3 Subespécie

As subespécies possuem uma diferença na disposição de folículos para aspiração. Segundo Baruselli et al., (2007), fêmeas *Bos indicus* apresentam uma disponibilidade maior de folículos ovarianos. Isto deve-se à elevada concentração de IGF-1, que recruta maior crescimento de folículos, mesmo quando o FSH se encontra em baixos níveis (GRÁZIA, et al., 2012).

De acordo com Seneda et al., (2001) doadoras *Bos indicus* possuem maior população de folículos menores que 4 mm em relação a doadoras *Bos taurus*, o que possibilita uma maior recuperação oocitária. Tal característica é apontada como uma vantagem significativa da aspiração folicular em fêmeas zebuínas.

O estresse térmico é um fator relevante na PIVE, tendo efeito direto na qualidade oocitária. O efeito é através do aumento do cortisol no hipotálamo, por meio do CRH (hormônio liberador de corticotrofina). Este inibe a secreção de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), em consequência diminui a liberação de LH e de FSH na hipófise anterior (PEREIRA, 2005)

Vacas *Bos taurus* são sensíveis a altas temperaturas e ao estresse térmico. Um estudo evidenciou que aspirações realizadas em meses de temperaturas

elevadas obtinham menor percentagem de oócitos viáveis na subespécie *Bos Taurus* (ROCHA, et al., 1998). Os zebuínos são menos suscetíveis aos efeitos de altas temperaturas devido à adaptação a ambientes sob influência de temperaturas mais elevadas.

3.1.4 Fase do ciclo estral

O CL é a principal estrutura ovariana que corresponde com a fase do ciclo estral em que a fêmea se apresenta (PENITENTE-FILHO et al., 2014). O CL também influencia o crescimento folicular, qualidade e quantidade de oócitos disponíveis no ovário (PFEIFER. et al 2009). A aspiração estratégica em fases específicas do ciclo estral é um fator de extrema importância para a PIVE. A fase mais adequada é o início da fase lútea, onde inicia a emergência da onda folicular, evitando assim a dominância e atresia dos demais folículos aspirados (HENDRIKSEN et al., 2004).

O tamanho dos folículos aspirados conforme aleatoriedade do ciclo influencia a qualidade e competência dos oócitos, diminuindo as taxas de produção embrionária (MACHATKOVA, et al., 2004). Conforme Ongaratto et al (2015), a sincronização com implante de P4 e injeção de BE, a aspiração ocorreu entre 6 e 7 dias após o início deste protocolo. Grande parte dos folículos encontrava-se entre 4 a 7 mm, pois é o momento que inicia a emergência de onda folicular, assim, obtendo maior taxa de recuperação e qualidade dos oócitos (SENEDA, et al., 2001). Portanto, a sincronização antes da OPU faz com que os oócitos encontrem-se no ovário em tamanhos adequados, possibilitando maior número de oócitos recuperados.

No decorrer do estágio curricular, as fêmeas eram aspiradas em fases aleatórias do ciclo estral, pois a estratégia de manipulação do ciclo seria um procedimento oneroso, que geraria custos adicionais à produção embrionária.

3.2 Fatores que afetam a eficiência reprodutiva de receptoras de embrião

Os programas de transferência de embriões experimentam muitas variações de resultados visto que são muitos os fatores os quais influenciam o seu sucesso.

Dentre eles serão descritas condições ligadas à própria receptora, bem como fatores externos, visando correlacionar com que foi vivenciado durante o ECSMV.

3.2.1 Nutrição

A nutrição é dos principais fatores ligados ao aumento da eficiência reprodutiva. Deve-se manter uma dieta balanceada para atender todas exigências de categoria, idade e sistema de criação dos animais. O ECC é uma ferramenta que possibilita identificar o estado nutricional dos animais por meio de avaliação subjetiva (MACHADO et.al., 2008). Esta ferramenta tem extrema importância para a avaliação nutricional dos animais em programas reprodutivos. Em um experimento foram avaliadas vacas no início de uma estação reprodutiva, onde foi constatado que a medida que o ECC aumentava as fêmeas se tornavam cíclicas (STEVENSON, JOHNSON, & MILLIKEN, 2003). Adicionalmente, animais com perda de peso e balanço energético negativo apresentam piores taxas de concepção (BEDERE et al., 2018). É importante atentar ao fornecimento de altas fontes proteicas, como a ureia, durante o vazio forrageiro, pois estas possuem potencial efeito negativo, como por exemplo, diminuição do PH uterino e baixa progesterona circulante, que podem levar a um ambiente desfavorável ao embrião (BUTLER, 1998). A empresa preconizava receptoras com escore ao redor de 3, onde é possível observar melhores resultados de prenhez (Figura 6), concordando com estudos de Stroud & Hasler, (2006), que indicam que os ECC intermediários 2 – 3 (escala de 1- caquético e 5 Obeso) obtinham maiores taxas de prenhez.

3.2.2 Sincronização de estro em protocolos de TETF

As receptoras de embrião ocupam lugar de destaque em um programa de TETF, pois irão levar a gestação a termo dos embriões de grande valor genético e comercial. Para a sincronização doadora/receptora vem sendo utilizados diferentes métodos de sincronização, visando obter maiores taxas de aproveitamento dos animais tratados (BARUSELLI et al., 2000). Para implementar os protocolos de sincronização de estro é essencial que um técnico responsável proponha abordagem adequada conforme características da propriedade (PFEIFER et al., 2009), com o objetivo de otimizar mão de obra, manejos e custos.

A utilização de hormônios análogos de prostaglandina é uma das formas de sincronização. Para sua utilização é necessário que as fêmeas estejam cíclicas. Ainda, deve-se atentar para o período do ciclo estral que se encontra. A fase ideal ocorre entre o 6° e 17° dia do último cio ocorrido, devido a presença de receptores para PGF2 α no corpo lúteo. Este tipo de manipulação hormonal envolve a observação de estro, após aplicação é esperado que as fêmeas apresentem sinais de estro cinco dias após o tratamento (BÓ et al., 2004).

O protocolo *ovysinch* e suas variações elimina a necessidade de detecção de cio e tem sido amplamente utilizado em países cuja aplicação de estrógenos e progestágenos não é permitida, (PFEIFER, et al., 2003). Constitui-se na aplicação de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) ou seus agonistas associado a luteolíticos, permitindo o controle do desenvolvimento folicular e da função lútea (PURSLEY, MEE, & WILTBANK, 1995). A aplicação de GnRH pode ser realizada em fases distintas do ciclo estral, e induz a liberação de LH, induzindo a ovulação do folículo em dominância. A ovulação propicia a liberação de FSH, em consequência, induzindo a emergência de uma nova onda de crescimento. O tratamento com GnRH no início do protocolo só será efetivo se causar a ovulação do FD (folículo dominante) (MARTINEZ et.al, 1999). Após 7 dias é realizada uma injeção de análogo de prostaglandina, para induzir a luteólise, reduzindo os níveis de progesterona endógena. Uma segunda dose de GnRH é realizada após 48 horas com o intuito de induzir o pico de LH em consequência a ovulação (MARTÍNEZ et al, 2002).

Outra forma de sincronização de grande eficiência de aproveitamento de receptoras é a aplicação de estrógenos somada a dispositivo intravaginal de progesterona. Neste contexto, o papel do estradiol é promover a atresia de folículos em dominância (BÓ et al., 1994) resultando em uma sincronização da onda de crescimento folicular. A aplicação do 17 β estradiol promove uma inibição do FSH até que haja metabolização do fármaco, este período é de 4 dias (BÓ et al., 1995) para que posteriormente os níveis de FSH sejam reestabelecidos emergindo uma nova onda de crescimento folicular. A progesterona exógena do dispositivo é responsável pela modulação da pulsatilidade de LH (STOCK & FORTUNE, 1993) impedindo a maturação folicular, estro e a ovulação do FD. Nos protocolos atuais a adição do eCG é indispensável, pois promove maior tamanho do FD, e em consequência, do CL, aumentando as concentrações de progesterona na fase lútea subsequente (SÁ

FILHO et al., 2010). O eCG tem efeito duplo de FSH e de LH (MURPHY & MARTINUK, 1991).

O cipionato de estradiol nos protocolos mais usuais é administrado junto a retirada do implante de P4, onde é utilizado como indutor de ovulação, pela sua praticidade. Foi possível diminuir um manejo, visto que sua meia vida plasmática é maior. O fármaco induz o pico de LH entre 45 a 49 horas e a ovulação entre 67 e 70 horas após a administração (SALES et al., 2012).

Os análogos de prostaglandina $PGF2\alpha$ nos protocolos atuais induzem a luteólise e permitem a ovulação. Pode-se utilizá-los na retirada do implante ou dois dias antes como é sugerido pela empresa. A administração dois dias antes da retirada do dispositivo de P4 é empregada visando proporcionar um maior crescimento do FD (SÁ FILHO, et al, 2009).

A luteólise promove a diminuição das concentrações de progesterona endógena, proporcionando maior pulsatilidade de LH no proestro (MENEGETTI et al., 2009). Visto que altas concentrações circulantes de progesterona durante o protocolo causam efeitos sobre o desenvolvimento folicular (DIAS et al., 2009). Menor crescimento folicular e ovulação de FD menores levam ao desenvolvimento de um CL menor e menor produção de P4.

Tendo em vista a praticidade de manejo e melhores resultados, a empresa preconizava o uso de protocolos a base de implante de liberação lenta de P4, análogos de $PGF2\alpha$, estrógenos e gonadotrofina coriônica equina, conforme indicado na (Figura 3).

3.2.3 Corpo lúteo

O corpo lúteo é a uma estrutura ovariana a qual se atribuí muitas funções ligadas a reprodução. Sua principal função é a produção de progesterona (VIEIRA, et al 2002). A progesterona tem papel fundamental na manutenção da gestação, atuando sobre o epitélio endometrial, onde induz a produção e secreção de fatores para o desenvolvimento embrionário (BARNES, 2000). A avaliação do CL fornece informações sobre o status reprodutivo do animal, sendo possível realizar manipulações do ciclo estral tendo como alvo a viabilidade do CL (VIANA, et al., 1999). Um dos fatores relacionados ao corpo lúteo é a administração do eCG, uma vez que este hormônio é responsável por um maior crescimento do folículo

dominante e ovulação, proporcionando um CL de maior tamanho e maior secreção de progesterona, normalmente associado a maiores taxas de prenhez (BARUSELLI et al., 2008). A empresa preconizava sempre pelo uso do fármaco para a sincronização, pois se obtêm maior aproveitamento de receptoras com a sua utilização.

O tamanho e classificação do CL é um fator de grande relevância para se obter maiores taxas de prenhez em receptoras de embrião. Em estudos realizados por BINELLI et al., (2001) e Nogueira et al., (2012) foi encontrado uma correlação positiva no tamanho do CL em relação à taxa de prenhez de receptoras no momento da ovulação. Já Leal et al. (2009) não observaram relação entre taxas de prenhez e tamanho do CL. Os dados da empresa conforme (Figura 5) é sugestivo de que o tamanho do CL é um fator determinante para se obter resultados satisfatórios de prenhez.

3.2.4 Inovulação

A inovulação é o ato de transferir o embrião para uma receptora previamente sincronizada para que seu trato reprodutivo esteja em sincronia com o estágio de desenvolvimento embrionário. O método de inovulação transcervical é o mais utilizado nos dias de hoje, uma vez que é menos invasivo do que as técnicas cirúrgicas anteriormente utilizadas. A deposição do embrião é feita no corno uterino ipsilateral a ovulação da receptora. Seidel et al., (1980) constataram que a inovulação no corno uterino ipsilateral ao ovário ovulatório obtinha maior efetividade do que a contralateral. Segundo Beal, Hinshaw, & Whitman (1998) maiores taxas de prenhez foram obtidas quando embriões foram transferidos para a porção do terço cranial do corno uterino em comparação ao terço caudal, independente da posição da inovulação em relação ao ovário ovulatório, se contralateral ou ipsilateral.

A manipulação do útero no ato da inovulação deve ser a menor possível, pois uma lesão por excesso de manuseio do útero desencadeia um aumento de PGF2 α no lúmen uterino (SCHRICK et al., 2000) sendo possível provocar uma luteólise prematura (SCENNA et al., 2004). Entretanto, algumas práticas podem ser utilizadas para evitar a luteólise precoce através de excesso de manipulação, como por exemplo a utilização de anti-inflamatórios.

3.2.5 Transferência de embriões a fresco e criopreservados.

A empresa priorizava a TE a fresco por possuir melhores resultados de prenhez. As taxas de gestação da empresa de embriões inovulados a fresco era de 44.66% (Figura 4), a qual coincide com trabalho realizado por Sanches et al., (2016) que obtiveram taxas de prenhez de 43,24%. Uma alternativa utilizada quando as taxas de embriões produzidos excediam o número de receptoras, era utilizadas técnicas para criopreservação de embriões. Esta técnica possibilita acondicionar os embriões em nitrogênio líquido para posterior sincronização das receptoras seguida por inovulação. Essas técnicas são empregadas também em locais com logísticas distantes, banco de embriões e venda de genética.

Os embriões produzidos *in vitro* são mais sensíveis que os *in vivo* a criopreservação (LEIBO & LOSKUTOFF, 1993). Sabe-se que os embriões produzidos *in vitro* possuem significativo acúmulo lipídico em seu citoplasma (ABE et.al, 2002). Um fator que reconhecidamente impactam esse acúmulo lipídico são os meios de cultivo que possuem como fonte proteica o soro fetal bovino (SFB) em sua composição (SUDANO et al., 2011). Por isso são propostas estratégias para se obter maiores taxas de sucesso na criopreservação, manipulando técnicas laboratoriais para melhorar a viabilidade das células embrionárias (DODE, LEME, L. O., & SPRÍCIGO, J. F. W. 2013).

A utilização do crioprotetores visam um maior equilíbrio osmótico entre a solução e o embrião. Essas substâncias são utilizadas com o intuito de impedir cristalização e o choque osmótico que ocorrem durante o procedimento de criopreservação. Estes são classificados como intracelulares e extracelulares. Os intracelulares interagem com moléculas da água intracelular e formam pontes de hidrogênio e diminuem a temperatura de congelação. Os mais utilizados são: propilenoglicol, glicerol, etilenoglicol, dimetilssulfóxido (DMSO), entre outros (Vajta e Nagy, 2006).

Os extracelulares atuam através de mecanismo osmótico, promovendo a desidratação celular controlada durante a congelação e impedindo a formação de grandes cristais de gelo no interior da célula (HOLT, 2000). Os mais utilizados são a lactose, glicose, sacarose, polivinilpirrolidona (PVP), manitol, trealose. (NIEMANN H, et .al 1991)

Dentro das técnicas de criopreservação dos embriões existe a vitrificação, que consiste em um congelamento rápido com duração de 80 segundos, devido à viscosidade de seus crioprotetores. A desidratação das células ocorre de forma rápida permitindo a imersão direta em N₂. Dentro dos benefícios a técnica não necessita de material de alto custo, além de bons resultados de sobrevivência embrionária pós-reaquecimento (VAJTA & NAGY, 2006). Porém, é uma técnica minuciosa necessitando de pessoas previamente qualificadas (SANCHES, et al., 2016).

Os dados da (Figura 4) são resultados de trabalhos realizados pela empresa, onde observa-se que a taxa geral de prenhez obtida foi de 33,33%, sendo superior ao estudo de Borges Filho et al., (2018) que obteve 24,09% de prenhez em embriões vitrificados.

A empresa também utilizava a técnica de congelamento lento. Esse procedimento possibilita a transferência direta em receptoras apenas com o auxílio de um descongelador, sem a necessidade de envase, avaliação embrionária e pessoal qualificado (SANCHES, et al., 2016).

Por ser uma técnica lenta levando cerca de 60 minutos necessita uma baixa concentração de crioprotetores, devido necessitar de um processo de desidratação lenta, diminuindo as lesões de membrana celular. Para diminuir os danos celulares no congelamento é realizado o processo de *seeding*. Este procedimento é realizado através do contato da palheta com um objeto metálico pré-refrigerado em nitrogênio líquido, consiste em evitar danos no resfriamento excessivo, desidratação da célula, lise da membrana e extravasamento das estruturas celulares (SANTOS et al., 2007; GUPTA et al., 2016). Neste processo de cristalização induzida visa melhorar as taxas de resfriamento do embrião para não influenciar negativamente na taxa de concepção (SANTIN, et al., 2009).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os programas de produção de embriões e transferência em tempo fixo são ferramentas que auxiliam na disseminação de animais de elevado mérito genético dentro de rebanhos e aumento dos índices produtivos para características desejadas. Durante o estágio foi possível observar os benefícios da utilização da PIVE, por exemplo: aceleração do ganho genético, disseminação de genética de animais superiores, assim, aumentando a produção de carne e leite de qualidade.

Mesmo sendo uma biotécnica consolidada ainda necessita de melhorias, como melhores taxas de prenhez, diminuição das perdas gestacionais indesejadas, etc. Possibilitou assim exercer senso crítico dentro das problemáticas vivenciadas durante o estágio.

O estágio curricular possibilitou aprimorar meus conhecimentos na área de biotecnologias reprodutivas, frequentar propriedades referência no setor de bovinocultura no Brasil, além de conhecer diferentes culturas e sistemas de criação e manejos em inúmeras regiões do país. Concluo que o estágio curricular foi de extrema importância para o aluno, visto que é a oportunidade para que os estudantes possam atuar e posicionar-se criticamente, desempenhando atividades relacionadas ao exercício da Medicina Veterinária em situações de demanda real e volume de atividades.

REFERÊNCIAS

- ABE, H. et al. Accumulation of Cytoplasmic Lipid Droplets in Bovine Embryos and Cryotolerance of Embryos Developed in Different Culture Systems Using Serum-Free or Serum-Containing Media. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 1, p. 57-66, jan. 2002.
- ABIEC. Perfil da pecuária no Brasil. **Associação Brasileira das indústrias Exportadoras de Carnes Bovinas**, p. 49, 2019.
- BARNES, F. L. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. **Theriogenology**, v. 53, n. 2, p. 649-658, jan. 2000
- BARUSELLI, P. S. et al. Factors that interfere with oocyte quality for in vitro production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p.264-272, jul/sept. 2016
- BARUSELLI, P. S. et al. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 205-211, 2007.
- BARUSELLI, P.S. et al. Ovsynch protocol with fixed-time embryo transfer increasing pregnancy rates in bovine recipients. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.I, n.28, p.205. 2000. Suppl
- BEAL, W. E.; HINSHAW, R. H.; WHITMAN, S. S. Evaluating embryo freezing method and the site of embryo deposition on pregnancy rate in bovine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 241, jan. 1998.
- BEDERE, N. et al. Meta-analysis of the relationships between reproduction, milk yield and body condition score in dairy cows. **Livestock Science**, v. 210, p. 73-84, apr. 2018.
- BEEF POINT. **Perfil da Pecuária no Brasil**. 2018. Disponível em: <<https://www.beefpoint.com.br/abiec-perfil-da-pecuaria-no-brasil>>. Acesso em: 31 de maio de 2019.
- BERNAL, S. U. et al. Effect of age and coasting period on oocytes quality and their in vitro development from prepubertal cattle. **Revista MVZ**, Cordoba, v. 16, n. 2, p. 2499-2506, may/aug. 2011.
- BINELLI, M. et al. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, n. 56, n. 9, p. 1451-63, dec. 2001.
- BÓ, G. A. et al. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, 32 (Supl): p.1-22. 2004
- BÓ, G. A. et al. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant, **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1555-1569. 1994.

BÓ, G. A. et al. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, n. 3, p. 193-204 39, aug. 1995

BORGES FILHO, Guilherme Nogueira. Taxa de concepção e gestação de embriões produzidos in vitro, transferidos a fresco ou criopreservado, em vacas e novilhas nelore. 2018.

BUTLER, W. R. Review: Effect of Protein Nutrition on Ovarian and Uterine Physiology in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 9, p. 2533-9, sep. 1998.

CARVALHO, F. A. N. et al. Nutrição de bovinos a pasto. **PapelForm** 2a. ed. Belo Horizonte. 2003 438p

DIAS, C. C. et al. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F2 α treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 72, n. 3, p. 378-85, jun. 2009.

DISKIN, M. G. et al. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 345-70, oct. 2003.

DODE, M. A. N.; LEME, L. O.; SPRÍCIGO, J. F. W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.145-150, abr./jun. 2013

GRÁZIA, J.G.V. et al. Associação da concentração de IGF plasmático e produção de oócitos e embriões em doadoras da raça Gir. . **Animal Reproduction Science**, v.9, p.404, 2012.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 212-217, abr./jun. 2007.

GUPTA, A.; SINGH, J.; ANZAR, M. Effect of cryopreservation technique and season on the survival of in vitro produced cattle embryos. **Animal Reproduction Science**, v.164, p. 162-168, 2016.

HENDRIKSEN, P. J. M. et al. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 61, n. 5, p. 909-920, apr. 2004.

HOLT W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**. v. 53: p. 47-58. 2000;

LANDRY, D. A. et al. Expression of atresia biomarkers in granulosa cells after ovarian stimulation in heifers. **Reproduction**, v. 156, n.3, p. 239-248, sep. 2018.

LEAL, L. S. et al. avaliação do corpo lúteo, contratilidade uterina e concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol em receptoras de embriões bovinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 174-183, jan./mar. 2009.

LEIBO, S. P.; LOSKUTOFF, N. M. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, n. 1, p. 81-94, jan. 1993.

MACHADO, R. et al. Escore da condição corporal e sua aplicação no manejo reprodutivo de ruminantes. **Embrapa Pecuária Sudeste-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2008.

MACHATKOVA, M. et al. Developmental competence of bovine oocytes: Effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, Pages 329-335, jan. 2004.

MARTINEZ, M. F. et al. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 57, n. 1-2, p. 23-33, oct. 1999.

MARTÍNEZ, M. F. et al. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1049-1059, feb. 2002.

MELLO, R. R. C et al. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 40, n. 2, p. 58-64, jun. 2016.

MELLO, R. R. C. et al. Fatores ligados à doadora que influenciam na produção de embriões in vitro (PIVE). **Revista Brasileira. Reprodução. Animal.**, Belo Horizonte, v. 40, n. 2, p. 51-57, abr./jun. 2016

MENEGHETTI, M. et al. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, ;v.72, n,2, p. 210-218, jul. 2009.

MORAES, G. V. et al. Oocyte aspiration and in vitro embryo production in Jersey cows with selenium-supplemented diet. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 64, n. 3, p. 787-795, 2012.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**,v 12, n. 1, p. 27-44, feb. 1991.

NIEMANN H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**.; v. 35, p. 109-24. 1991

NOGUEIRA, É. et al. Effect of breed and corpus luteum on pregnancy rate of bovine embryo recipients. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, n. 9, sep. 2012.

ONGARATTO, F. L. et al. Effect of follicle wave synchronization and gonadotropin treatments on the number and quality of cumulus-oocyte complex obtained by ultrasound-guided ovum pick-up in beef cattle. **Anim Reproduction Science**, v. 12, n. 4, p. 876-883, 2015.

PENITENTE-FILHO, J. et al. Influence of Dominant Follicle and Corpus luteum on Recovery of Good Quality Oocytes for In vitro Embryo Production in Cattle. **British Biotechnology Journal**, v. 4, n. 12, p. 1305-1312, oct. 2014.

PEREIRA C.C.J. Fundamentos de Bioclimatologia Aplicados à Produção Animal. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2005.

PFEIFER, L. F. M. et al. Effect of circulating progesterone on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Animal reproduction**, v.6, n.3, p.473-480, Jul./Sept. 2009.

PFEIFER, L.F.M.; CORRÊA, M.C.; PINESCHI, L.E. Alternativas hormonais para programas de transferência de embriões em bovinos, 2003. Disponível em:<https://wp.ufpel.edu.br/nupeec/files/2018/09/mod.-revis%C3%A3o-bibliogr%C3%A1fica.pdf> Acesso em: 25 mai. 2019

PIETRO S. BARUSELLI. et al. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. 3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada Londrina. 2008. **Anais**. Londrina: 3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada.2008 p. 146-167.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, nov. 1995.

ROCHA, A. et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 49, n. 3, p. 657-665, feb. 1998.

SÁ FILHO, M. F. et al. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 2, p. 182-187, apr. 2010.

SALES, J. N. S. et al. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510-516, aug. 2012.

SANCHES, B. V. et al. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1147-1151, apr. 2016.

SANTIN, T. R. et al. Criopreservação de embriões – metodologias de vitrificação. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, p. 561-574, 2009.

SANTOS, R. R. et al., Vitrification of goat preantral follicles eclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. **Cell and Tissue Research**, v, 327, n, 1, p. 167-176, 2007.

SARTORI, R. et al. Fertilization and Early Embryonic Development in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. **Journal of Dairy**

Science, v. 85, n. 11, p. 2803–2812, nov. 2002.

SAUD S. Depois de retomada em 2017, Brasil já insemina 12% das fêmeas de corte Giro do Boi, 30, março e 2018. Disponível em: <https://www.girodoboio.com.br/destaques/apos-retomada-das-vendas-de-semen-brasil-ja-insemina-12-das-femeas-de-corte/>

SCENNA, F. N. et al. Detrimental effects of prostaglandin F2 α on preimplantation bovine embryos. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 73, n. 3–4, p. 215–226, apr. 2004.

SCHRICK, F. N. et al. Prostaglandin F2 α appears to directly influence early embryonic 119 survival in cattle: Would administration of Flunixin Meglumine be beneficial during embryo transfer? **Proceedings, American Embryo Transfer Association**, p.9, 2000.

SEIDEL, G. E. Critical review of embryo transfer procedures with cattle. In: Mastroianni, L. Jr., Biggers, J. D. (Eds) **Fertilization and embryonic development in vitro**. Springer, Boston, p. 323-353. jan. 1981.

SENEDA, M. M. et al. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 1–2, p. 37–43, 2001.

SIDDIQUI, M.A.R. et al. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. **Reprod. Domestic Animals**, v.37, n.1, p.37-41, 2002

STEVENSON, J. S.; JOHNSON, S. K.; MILLIKEN, G. A. Incidence of postpartum anestrus in suckled beef cattle: treatments to induce estrus, ovulation and conception. **The Prof. Anim. Sci**, v. 19, n. 2, p. 124-134, apr. 2003.

STOCK, A. E.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v. 132. n.3, p. 1108-14, mar. 1993.

STROUD, B.; HASLER, J. F. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 65-76, jan. 2006.

SU, L. et al. Effect of Donor Age on the Developmental Competence of Bovine Oocytes Retrieved by Ovum Pick Up. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 184-189, apr. 2012

SUDANO, M. J. et al. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1211-1220, apr. 2011.

SWANGCHAN-UTHAI, T. et al. Comparison of mRNA for IGFs and their binding proteins in the oviduct during the peri-oestrous period between dairy heifers and

lactating cows. **REPRODUCTION**, v. 142, n. 3, p. 457-465, sep. 2011.

VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive biomedicine online**, v. 12, n. 6, p. 779–796, apr. 2006.

VIANA, J. H. M. Jornal O embrião. **Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões SBTE**, v. 62. ano XXXII, p. 7, ago/dez. .2018.

VIANA, J. H. M. et al. Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte vol. 51, n. 3, p. 251-256, june. 1999.

VIANA, J. H. M. et al. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 1–2, p. 1-12, aug. 2004.

VIEIRA, R. et al. relação entre a morfologia do corpo lúteo e índices de prenhez em receptoras de embriões bovinos. **Original Article Biosci J**, v. 18, n. 2, p. 99–102, dec. 2002.

WARZYCH, E. et al. Prepubertal heifers versus cows—The differences in the follicular environment. **Theriogenology**, v. 87, p. 36-47, jan. 2017.

ANEXO I

Certificado de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária empresa
ABS Pecplan

CERTIFICADO DE ESTÁGIO

*Certificamos que **Marco Antonio Menine Viêlmo** concluiu o*

estágio obrigatório em Bovinocultura (FIV, Diagnóstico de Gestação, Ultrassonografia,

Transferência de embriões, Avaliação de Receptoras, Aspiração Follicular)

entre os dias 14/01/2019 a 03/05/2019, com carga horária de 600 horas,

na IVB Technologies.

15 de maio de 2019

Mariana C. Afonso

Mariana C. Afonso
Recursos Humanos

