

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAINA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

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

Orientador: Fabrício Desconsi Mozzaquatro

Fábio Flain Piffero

Uruguaiana, junho 2018

FÁBIO FLAIN PIFFERO

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

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária, apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Fabrício Desconsi Mozzaquatro
Médico Veterinário, Ms, Dr.

**Uruguaiana
2018**

FÁBIO FLAIN PIFFERO

Relatório de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária, apresentado ao Curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana, da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Biotecnologia da Reprodução

Relatório apresentado e defendido em 18 de junho de 2018.

Prof. Dr. Fabrício Desconsi Mozzaquatro
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Prof. Dr. Fábio Leivas
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Prof. Dr. Daniela dos Santos Brum
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Dedico essa conquista a minha Família, que sempre me apoiou neste meu objetivo que tive desde sempre, e me deu condições tanto emocionais quanto financeiras para que eu nunca desistisse.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a DEUS, pelas bênçãos que tenho recebido, e das quais sempre serei grato.

Quero agradecer a toda minha família, que sempre me incentivou na busca pelo conhecimento e qualificação profissional.

Especialmente meus pais que sempre me apoiaram, mesmo com dificuldades nunca me disseram não, quando o assunto era para o meu crescimento profissional e pessoal. Por me mostrarem os valores de uma família e ao verdadeiro significado das palavras pai e mãe, a vocês devo tudo que sou hoje amo muito vocês, MUITO OBRIGADO.

A minha irmã que mesmo de longe estava sempre perto, me apoiando nas decisões, por ser minha melhor amiga a pessoa que eu sempre recorri para qualquer situação, obrigado Lala, Te amo.

Agradeço meus amigos, que mesmo de longe, pois cada um foi atrás do seu objetivo, nossa amizade sempre continuou a mesma e assim sempre vai ser, obrigado pessoal “Da antiga”.

Agradeço aos amigos feitos nessa caminhada em Uruguaiana, pessoas as quais me ajudaram muito ao longo de toda graduação!

Aos meus colegas de laboratório que participaram dia-a-dia durante a faculdade.

Ao pessoal da IN VITRO BRASIL, por todo empenho dedicado a mim, por ter acreditado no meu potencial. Pelos ensinamentos transmitidos de forma pacienciosa e atenciosa, agradeço a cada um dos profissionais que tive a oportunidade de acompanhar, e pela amizade construída durante todo estágio, principalmente aos veterinários que me receberam em sua casa.

Agradeço ao Professor Dr. Fabrício Desconsi Mozzaquatro, pela amizade e confiança depositada a mim durante a jornada dentro da veterinária. Meu agradecimento especial por ter exercido da melhor forma a profissão de professor e Médico veterinário, onde me transmitiu grandes momentos de aprendizado tanto para vida profissional quanto pessoal. Tenho orgulho de ter sido seu aluno e ter dividido estes momentos que também foram de companheirismo, lazer e descontração, meu Muito Obrigado.

Agradeço aos demais mestres do curso de Medicina Veterinária da UNIPAMPA que sempre estavam a disposição para transmitir seus conhecimentos, assim enriquecendo meu aprendizado e sempre incentivando a melhorar.

Agradeço também a Universidade Federal do Pampa, por nos fornecer um ensino público de qualidade, tornando-nos profissionais capazes de enfrentar as dificuldades da vida profissional sempre com ética, respeito, disciplina, educação e humildade perante o próximo.

MUITO OBRIGADO!

*“O foco pode trazer resultados
extraordinários para a sua vida”*
Gary Keller

ESTÁGIO CURRICULAR SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA – ÁREA DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO

O presente relatório visa descrever as atividades acompanhadas e/ou realizadas no período de execução do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV), na área de biotecnologias da reprodução. No período reservado ao estágio foi possível realizar atividades em dois setores da empresa, laboratório e campo contemplando várias etapas do processo de produção *in vitro* de embriões (PIVE). O local escolhido foi a empresa IN VITRO BRASIL/SA (IVB), com matriz localizada em Uberaba, no estado de Minas Gerais - BR, com mais filiais no Brasil, como Mogi Mirim – SP e Xinguara – PA. O ECSMV teve orientação do professor Dr. Fabrício Desconsi Mozzaquatro e supervisão do Médico Veterinário Eduardo Trevisol CRMV-22739/SP durante o período de 05 de Janeiro a 25 de abril de 2018, totalizando 624 horas. O setor de biotecnologia da reprodução está em constante transformação sendo uma das áreas em maior evidência no país e no mundo, apresentando várias oportunidades no mercado de trabalho. A escolha do local de estágio foi pautada na excelência dos trabalhos prestados pela IVB o que atualmente coloca a empresa como uma das maiores no ramo de biotecnologia animal. Dentro da empresa pude acompanhar todas as etapas da Produção *in vitro* de Embriões na unidade de Mogi-Mirim SP, onde atendia várias propriedades espalhadas por todo Brasil. Esta biotecnologia vem apresentando grande expansão na reprodução bovina, mostrando ser uma boa opção para melhoramento genético e aumento da produção leiteira e de carne. O estágio foi muito importante para minha formação profissional, pois tive a oportunidade de acompanhar a rotina de aspiração folicular, seleção de doadoras e receptoras, maturação *in vitro*, fertilização *in vitro*, cultivo *in vitro*, avaliação e envase de embriões, vitrificação de embriões, diagnóstico de gestação e sexagem fetal, e breve discussão sobre seleção e sincronização de doadoras/receptoras e aspiração guiada por ultrassonografia, em uma empresa do porte da IVB, vivenciando as diversas realidades onde o médico veterinário pode estar inserido.

Palavras chaves: PIVE, Embrião, Biotecnologia, OPU.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Atividades Realizadas no Campo	17
TABELA 2: Atividades Realizadas no Laboratório.....	18
TABELA 3: Porcentagem de produção de embriões	32
TABELA 4: Porcentagem da taxa de Prenhez de embriões transferidos a fresco e desvitrificados.....	33

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Mapa com destaques onde a IVB está presente no mundo.....	16
FIGURA 2: Salas e materiais presentes no laboratório de PIVE da IVB/Mogi-Mirim/SP. A: Fyrite, medidor de gás; B: Incubadoras; C: Geladeira de meios; D: Sala de botijões; E: Fluxo para realizar procedimentos da PIVE.....	17
FIGURA 3: Doadoras sendo selecionadas para um programa de OPU em um curral na Fazenda Segredo localizada no município de Bataguassu/MT.....	19
FIGURA 4: Receptoras avaliadas na Fazenda Segredo localizada no município de Bataguassu/MT para iniciar protocolo hormonal de sincronização.....	20
FIGURA 5: Equipamentos para coleta e transporte de oócitos utilizados para realizar a OPU. A: Bomba de vácuo; B: Bomba de vácuo; C: Transportadora de oócitos; D: Transportadora de oócitos.....	23
FIGURA 6: Ficha de campo com dados da doadora, acasalamento e classificação dos oócitos.....	23
FIGURA 7: Incubadora com raques onde ficavam armazenados os Criotubos com meios MIV ao chegar das propriedades.....	24
FIGURA 8: Materiais utilizados na rotina laboratorial para o procedimento de FIV. A: placa de petri identificada para FIV; B: Garrafas identificadas onde eram acondicionadas as placas; C: Centrífuga para preparação do sêmen na FIV.....	26
FIGURA 9: Etapas do cultivo <i>in vitro</i> de embriões. A: Diferentes estádios de embriões; B: Transportadora com embriões já envasados com palhetas devidamente acondicionadas.....	28
FIGURA 10: Processo de vitrificação dos embriões. A: Indetificação das OPS; B: Deposição dos embriões nos poços com meios de vitrificação.....	29
FIGURA 11: Sequência de envase dos embriõ0065s na palheta de 0,5mL.....	31
FIGURA 12: Imagem ultrassonográfica realizada para confirmação de prenhes aos 60 dias com a evidência do tubérculo genital para a sexagem fetal.....	34

LISTAS DE ABREVEATURAS

µL	microlitro
BE	Benzoato de Estradiol
BL	Blastocisto
BN	Blastocisto em Eclosão
BX	Blastocisto Expandido
CE	Cipionato de Estradiol
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i>
CL	Corpo Lúteo
DG	Diagnóstico de Gestação
ECC	Escore de Condição Corporal
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
ECSMV	Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária
FIV	Fertilização <i>In Vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IM	Intramuscular
IVB	IN VITRO BRASIL S/A
LH	Hormônio Luteinizante
LH	Hormônio Luteinizante
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
OPS	Open Pulled Straw
OPU	Aspiração Folicular Guiada por Ultrassonografia
P4	Progesterona
PGF2 α	Prostaglandina
PGF $_2\alpha$	Prostaglândina
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de Embrião
SX	Sexagem
TE	Transferência Embrionária
TETF	Transferência Embrionária em Tempo Fixo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	15
2.1	Seleção de doadoras.....	18
2.2	Seleção e protocolo de sincronização de receptoras.....	19
2.3	Aspiração Folicular guiada por Ultrassonografia.....	21
2.4	Maturação <i>In Vitro</i>	24
2.5	Fertilização <i>In Vitro</i>	25
2.6	Cultivo <i>In Vitro</i>	26
2.7	Vitrificação.....	29
2.8	Desvitrificação.....	30
2.9	Transferência Embrionária em Tempo Fixo.....	30
2.10	Diagnóstico de Gestação.....	32
2.11	Sexagem Fetal por Ultrassonografia/Confirmação de Prenhez.....	33
3	DISCUSSÃO.....	35
3.1	Produção in vitro de Embriões.....	35
3.2	Seleção de Doadoras e Receptoras.....	35
3.3	Protocolos de Sincronização Doadoras/Receptoras.....	37
3.4	Aspiração Folicular Guiada por Ultrassonografia.....	39
4	CONCLUSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42
	ANEXOS A.....	47

1 – INTRODUÇÃO

O crescimento populacional, de renda per capita e da urbanização observados nos últimos anos associados as previsões para as próximas décadas ampliam as necessidades de produção de alimentos no mundo para o futuro (SAATH, FACHINELLO, 2018).

Ultimamente a produtividade dos rebanhos bovinos vem aumentando, e isso é atribuído à intensa seleção de características genéticas e do aperfeiçoamento de biotécnicas de manejo reprodutivo visando maximizar a qualidade dos sistemas de produção (MELLO et al., 2016).

Os sistemas de melhoramento genético juntamente com nutrição, sanidade e biotecnologias da reprodução podem levar a promoção de resultados melhores dentro das propriedades e com isso proporcionar maiores lucros. Devido a isso, os produtores investem nestes setores aumentando a procura por estas técnicas. É nesse cenário que as biotécnicas da reprodução, veem se fortalecendo no mercado agropecuário, como uma ferramenta de apoio para bovinocultura. Existem várias biotecnologias ligadas à reprodução como inseminação artificial, IATF, superovulação, coleta e transferência de embriões, Produção *in vitro* de Embriões (PIVE) e clonagem. Dentre estas, a PIVE, destaca-se pela capacidade de multiplicação de matrizes de alto valor genético em um curto intervalo de tempo em larga escala (SILVA et al., 2015).

Em 2014 o Brasil foi considerado o maior produtor mundial de embriões com 366.517 unidades produzidas por ano, 70% da produção mundial. A Fertilização *in vitro* (FIV) nos últimos 15 anos, teve um crescimento de 300%, saindo de 160.695 embriões produzidos em 2002 para 666.215 em 2016, sendo que neste mesmo ano, ultrapassou pela primeira vez o volume de embriões produzidos *in vivo* (IETS, 2015; MELLO et al., 2016). Na PIVE o Brasil possui uma posição importante no cenário mundial, onde 57,7% dos embriões produzidos no mundo em 2015 foram de empresas brasileiras, representando um montante de 353.539 do total de 612.709 embriões produzidos no mundo (IETS, 2015). Estes números estão relacionados com projetos de produção de embriões em alta quantidade que levam a diminuição de custos, aumentando a produção.

O emprego desta biotecnologia para programas de melhoramento genético possibilita otimizar o potencial de matrizes dentro dos rebanhos, promovendo multiplicação de animais melhores em pouco tempo, quando se é comparado as biotécnicas mais comumente utilizadas (IA e TE).

Neste cenário, atualmente a IN VITRO BRASIL (IVB) é a maior empresa prestadora de serviços em Produção *in vitro* no Brasil. A IVB, é uma empresa multinacional especializada em PIVE de bovinos e equinos e clonagem. Hoje é constituída de nove laboratórios localizados no Brasil, Estados Unidos, Rússia, Colômbia, México e Moçambique. Sua matriz está localizada em Uberaba – MG/Brasil. Além disso, a empresa possui diversas franquias, presentes em diversos países, onde são comercializados meios de cultura e protocolos de produção *in vitro*. A IVB trabalha oferecendo serviços de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU), PIVE, transferência de embriões (TE), diagnóstico de gestação, sexagem e clonagem.

Devido a todas estas atividades desenvolvidas pela empresa e do grande interesse pessoal em biotecnologias da reprodução a IVB foi escolhida para realizar o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV).

O presente relatório tem o objetivo de apresentar a descrição das atividades acompanhadas durante o ECSMV, discutindo a seleção de doadoras e receptoras e o procedimento de aspiração folicular.

2 – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O ECSMV foi realizado na IN VITRO BRASIL S/A (IVB), criada em 2002 e hoje a maior empresa de produção de embriões *in vitro* em atividade no Mundo. No Brasil conta com três laboratórios localizados em Uberaba – MG, Xinguara – PA e Mogi-Mirim – SP. Hoje no total são 37 laboratórios entre próprios e afiliados dispostos em 17 países (FIGURA 1). Por tudo que construiu e a dimensão que a empresa alcançou durante esses anos, levantou interesse do grupo Genus PLC que em 2015 comprou 51% de suas ações e desde então continua a fornecer as melhores soluções genéticas para seus clientes.

A empresa também oferece o serviço de compra e venda de genética, onde o produtor disponibiliza a receptora para embriões de alta genética tanto de produção leiteira quando de carne, a partir de vários acordos comerciais e projetos em grande escala. A IVB hoje produz uma média de 10.000 embriões somente para testes de produção de seus meios de cultura. Estes são feitos na filial da IVB em Mogi Mirim/SP. Os meios são utilizados para a produção comercial da própria empresa e vendidos para laboratórios franqueados ao redor do mundo (IN VITRO BRASIL, 2018).

A IVB (unidade Mogi-Mirim/SP) foi a escolhida para a realização do ECSMV. Embora seja uma filial, tem grande importância, pois apresenta maior número de clientes e a maior produção anual da empresa. Esta é composta por 32 veterinários entre a área de laboratório e profissionais do campo. A unidade dispõe de um local alugado dentro de uma fazenda. Este local é composto de um laboratório devidamente, credenciado no MAPA, e adequado para a realização de todas as etapas da Produção *in vitro* de embriões (PIVE) como a Maturação *in vitro* (MIV), FIV, Cultivo *in vitro* (CIV), Envase e Vitrificação de embriões. Apresenta 1 bancada, 8 incubadoras reguladas com fluxo de gás (FIGURA 2B), 5 capelas de fluxo laminar contínuo (FIGURA 2E), 2 geladeiras (FIGURA 2C) para armazenamento de meios. Ainda consta com uma sala separada com 4 incubadoras e 1 capela de fluxo laminar contínuo, somente para testes dos meios de cultivo. O laboratório consta ainda com salas individuais para produção de meios, estoque de botijões (FIGURA 2D), estoque de materiais, esterilização de materiais, armazenamento de materiais utilizados a campo, sala de computadores para organização da logística e rotina dos veterinários que atuam no campo e no laboratório e um escritório com 9 computadores para realizar toda burocracia de administração da empresa.

A unidade atende vários clientes em todo o território nacional e um cliente na Rússia. A rotina era baseada conforme a demanda de embriões conforme contrato feito pela empresa

e cliente. Desta forma eram organizadas datas para protocolo de sincronização das receptoras, Aspiração Folicular e Transferência Embrionária. Assim era lançada a agenda para todos os profissionais da empresa. Os laboratoristas começavam sua rotina baseado no dia de OPU, para assim dar sequência aos procedimentos de PIVE.

O ECSMV teve carga horária total de 624 horas sob a supervisão da Bióloga Junia Carvalho e do Médico Veterinário Eduardo Trevisol. O ECSMV foi dividido em um período realizado acompanhando as atividades dos veterinários nas fazendas e um período acompanhando a rotina do laboratório de PIVE.



FIGURA 1 – Mapa com destaques onde a IVB está presente no mundo.

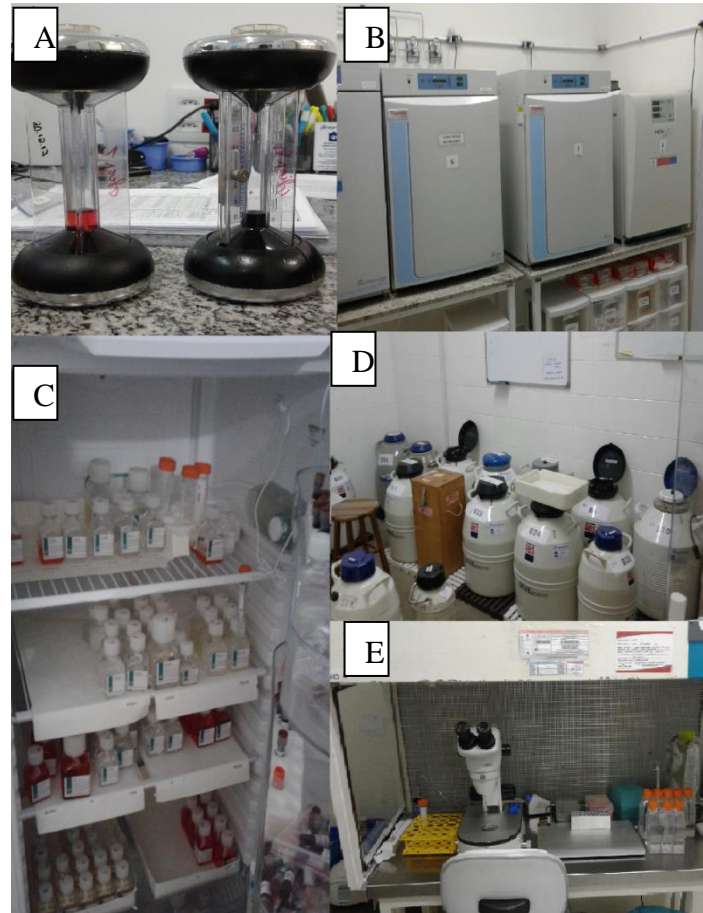


FIGURA 2 – Salas e materiais presentes no laboratório de PIVE da IVB/Mogi-Mirim/SP. A: Fyrite, medidor de gás; B: Incubadoras; C: Geladeira de meios; D: Sala de botijões; E: Fluxo para realizar procedimentos da PIVE.

As tabelas a seguir demonstram as atividades acompanhadas e/ou realizadas durante o ECSMV.

TABELA 1 - Atividades acompanhadas a campo no ECSMV.

Descrição da atividade	Nº de Atividades	Nº de Animais	%
Seleção e protocolo de receptoras	20	650	11,4
Aspiração folicular	22	594	12,6
Transferência embrionária em tempo fixo	20	1.150	11,4
Diagnóstico de gestação	45	1.110	25,8
Sexagem	8	250	4,5
Total	174	25.706	100

TABELA 2 - Atividades acompanhadas dentro do laboratório da empresa.

Descrição da atividade	Nº de Atividades	Nº de oócitos/embriões	%
Maturação <i>in vitro</i>	13	594	20,9
Fecundação <i>in vitro</i>	12	12.505	19,3
Cultivo <i>in vitro</i>	12	8.342	19,3
Avaliação/Envase de embriões	17	845	27,4
Vitrificação de embriões	8	247	12,9
Total	62	22.533	100

2.1 Seleção de doadoras

A seleção das doadoras era uma etapa de grande importância dentro da técnica de PIVE, visto que as mesmas transmitem todas as características genéticas que seriam herdadas pela próxima geração.

De maneira geral a seleção de doadoras era feita por equipes especializadas, com médicos veterinários da empresa. Desta forma estes técnicos realizavam exame ginecológico através de palpação transretal com auxílio do ultrassom.

As doadoras que apresentassem gestação avançada com mais de 4 meses, ou ovários com pequena população folicular ou aderências/patologias ovarianas não eram aspiradas. As doadoras também eram avaliadas conforme sua saúde reprodutiva, escore de condição corporal, calendário de vacinação em dia e ausência de patologias do trato reprodutivo.

Em outros casos o próprio pecuarista ou técnico da fazenda, realizava a escolha das doadoras, levando em conta o valor monetário, zootécnico, histórico de premiações e procura por aquela determinada genética.



FIGURA 3 – Doadoras sendo selecionadas para um programa de OPU em um curral na Fazenda Segredo localizada no município de Bataguassu/MT.

2.2 Seleção e protocolo de sincronização de receptoras

A seleção de receptoras eram um dos desafios para o sucesso da PIVE pois são estas fêmeas que levarão a gestação a termo. Assim, estas fêmeas, deviam ser devidamente avaliadas através de exame ginecológico completo para identificação dos indivíduos que estavam aptos para a reprodução.

A IVB seguia alguns critérios neste processo de seleção. Sendo realizado quase que um pré avaliação antes do processo de sincronização. Dentre estes a escolha de animais saudáveis, que apresentavam vacinas reprodutivas em dia, escore de condição corporal (ECC) adequado (3), onde era seguida uma escala de 1 a 5 (1- animal magro e 5 - animal gordo).

Além disso, no exame ultrassonográfico, eram avaliados a presença de corpo lúteo (CL), folículo dominante e o aspecto uterino. Estes eram com o objetivo de incluir no protocolo de sincronização, receptoras que estivessem ciclando. Esta prática propiciava com que um maior número de fêmeas respondesse ao protocolo.

Os veterinários da empresa orientavam os produtores que utilizassem boas condições nutricionais para as receptoras com uma oferta de suplementação adequada, para melhorar seu aporte energético e otimizar os resultados.

Nos serviços prestados pela empresa as receptoras eram avaliadas no dia 0 (D0) e no dia da TE, dia 17 (D17), deixando o proprietário orientado da aplicação dos hormônios para o protocolo de sincronização.

O protocolo era orientado da seguinte forma: No D0, as fêmeas destinadas para receptoras, consideradas aptas, recebiam o implante intravaginal de progesterona (P4) e 2 mL de benzoato de estradiol (BE) intramuscular (IM). No dia 8 (D8) o implante de P4 era retirado e o animal recebia 2 mL de prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$) IM que tem função de promover luteólise. Neste momento administrava-se ainda 1 ou 0,5 mL de Cipionato de Estradiol (CE) IM, e mais 2 mL de Gonadotrofina coriônica equina (eCG) IM. No Dia 10 (D10) era recomendado, quando possível, observar a manifestação de estro.

A TE era realizado no D17 nas receptoras que apresentassem CL, caso o CL estivesse presente era classificado em uma escala de 1 a 3 (1 – regular e 3 – ótimo) para assim realizar a T.E. Embora os veterinários realizassem esta classificação, todas as receptoras com CL eram inovuladas, não sendo um critério de descarte.

Ao fim desta etapa, realizava-se uma estimativa percentual dos animais que responderam ao protocolo hormonal em cada cliente. Esta prática era realizada para adequar a quantidade de embriões a serem transferidos em serviços futuros na propriedade. No geral a empresa trabalhava com uma estimativa de 80% de resposta nas receptoras.



FIGURA 4 – Receptoras avaliadas na Fazenda Varjão localizada no município de Bambuí/MG para iniciar protocolo hormonal de sincronização.

2.3 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia

A aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU), consistia na aspiração dos dois ovários da doadora e em seguida a seleção dos oócitos recuperados. Esta etapa era realizada na propriedade, com o animal em um tronco de contenção e o selecionador em uma sala retirada com os equipamentos laboratoriais necessários.

O procedimento de OPU era realizado independente da fase do ciclo estral. Durante o ECSTMV não foi observado nenhum protocolo hormonal para de sincronização de onda folicular nas doadoras.

A rotina diária da empresa se dava da seguinte forma: Por volta das 4:30 a 5:00h era separado o material a ser utilizado, sendo carregados em um automóvel para deslocamento da equipe técnica. Na propriedade era então montado o laboratório de campo em sala fechada e no tronco de manejo era organizado os equipamentos da OPU. No primeiro momento após contenção dos animais, realizava-se tricotomia da região sacrococcígea e aplicação de anestesia epidural baixa com lidocaína 2% (FIGURA 5) entre espaço S5-C1, o volume aplicado variava de 1-5 mL/animal, variando conforme a raça e ECC. Após era realizada a limpeza do reto e iniciava-se o procedimento de OPU. O técnico introduzia a guia de aspiração juntamente com madril via transvaginal, até chegar ao fundo de saco vaginal.

A guia de aspiração é composta por uma estrutura de acrílico onde está acoplado o transdutor micro-convexo do aparelho de ultrassonografia. Na porção superior, estava posicionado o mandril com um cateter (18G, 1,2mm). Este catéter estava acoplado a um sistema de mangueiras que via pressão negativa (vácuo) conduzia o líquido aspirado para um tubo de coleta cônico de 50 mL. Estes tubos continham uma solução DPBS com 400 µL de heparina e ficavam em um aquecedor de bolso em temperatura de 36°C, junto ao Médico Veterinário.

Com a mão no reto da doadora o técnico posiciona o ovário no transdutor de forma que possa visualizar os folículos que serão aspirados. Após era acionado o sistema de vácuo e o procedimento de OPU era realizado. Eram aspirados todos os folículos visíveis no campo ultrassonográfico, independente do tamanho. O líquido folicular aspirado é conduzido até um tubo cônico.

Na mesma bomba de vácuo (FIGURA 6A) existia um espaço reservado para banho-térmico seco, onde ficavam localizados os tubos que seriam utilizados a cada vaca e o tubo com 40 mL de solução de lavagem (solução de DPBS) aquecidos a 36°C.

Após o fim da aspiração o Médico Veterinário removia a guia da vagina da doadora, retira de dentro da guia o mandril, pega o tubo contendo a solução de lavagem e aspirava algumas vezes a solução aumentando a pressão da bomba de vácuo. Este procedimento era realizado para evitar que algum oócito recuperado pela aspiração, ficasse aderido no sistema.

A lavagem tinha função também de remoção dos coágulos que podiam obstruir o sistema e diminuir a quantidade de oócitos aspirados. Após, os tubos eram identificados através do registro da associação da doadora (RGD), e então encaminhados ao selecionador. Os oócitos sempre eram transportados com muito cuidado, evitando agitações e incidência de luz solar.

No laboratório da fazenda, o selecionador preparava previamente, uma placa de petri 90mm com gotas de lavagem com solução de DPBS. O conteúdo folicular era depositado em um filtro, sendo lavado várias vezes com solução DPBS para retirada de sujidades e conteúdo sanguinolento. Este conteúdo retido no filtro era depositado em outra placa de petri 90mm e com o auxílio de uma lupa estereomicroscópica iniciava o procedimento de seleção e classificação com posterior coleta do oócitos.

Após todos os oócitos terem sido selecionados e classificados eram lavados em uma sequência de cotas conforme protocolo: uma gota de Meio de lavagem + Meio MIV (MLMIV) após em mais 2 gotas de MLMIV por fim em uma gota contendo somente meio MIV.

Após a lavagem eram classificados da seguinte forma- Grau I: com células do cumulus compacta e mais de três camadas de células e ooplasma com granulações finas e homogêneas, Grau II: com menos de três camadas de células do cúmulus e ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, Grau III: com células do cúmulus presente porém expandida e ooplasma contraído, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, Desnudos, Citoplasma irregular e Degenerados (FIGURA 7).

Após a classificação os oócitos eram armazenados em criotubos contendo 400µl de meio de maturação (M-MIV) e 300µL de óleo mineral previamente caseificados em estufa a 5% de CO₂. Estes tubos contendo os oócitos eram acondicionados na transportadora de oócitos (FIGURA 6C) para serem remetidos ao laboratório. O processo de MIV já era iniciado durante o período do transporte. Ao chegar no laboratório estes microtubos eram acondicionados em raques identificadas e ficam dentro de incubadoras até o momento da FIV.

Todas as informações contidas no tubo, feitas pelo técnico eram registradas em uma ficha de controle assim como o touro que seria usado para o acasalamento.

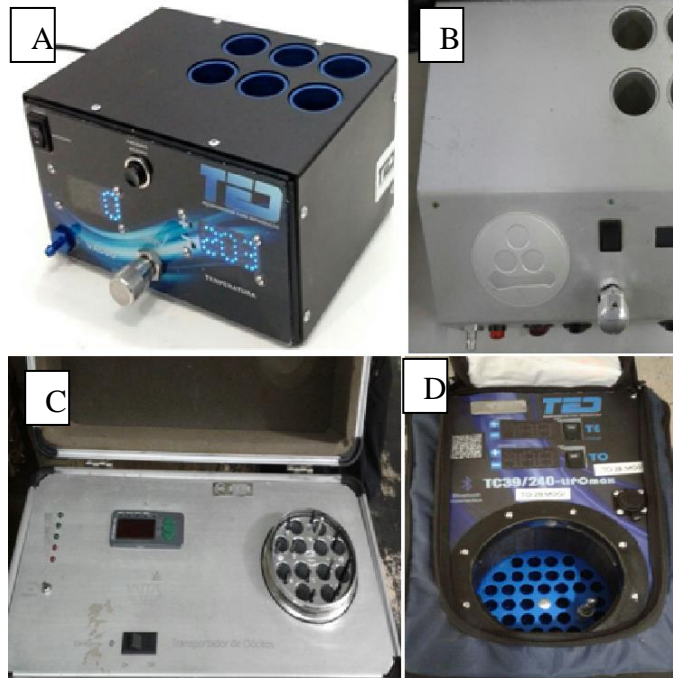


FIGURA 5 – Equipamentos para coleta e transporte de oócitos utilizados para realizar a OPU. A: Bomba de vácuo; B: Bomba de vácuo; C: Transportadora de oócitos; D: Transportadora de oócitos.

Mogi Mirim Rod SP 340, km 166 - Cx. Postal 238 CEP 13800-970 - Mogi Mirim - SP contato@invitrobrasil.com.br (19) 99839-2889 / 98244-3500															Uberaba Rua Goiás, 1840 - Santa Maria CEP 38050-060 - Uberaba - MG contato@invitrobrasil.com.br (34) 3314-7860 / 99908-8635					Pará Av. Xingu, 268 CEP 68555-010 - Xinguara - PA contato@invitrobrasil.com.br (94) 98112-3836 / 98174-0102				
CERTIFICADO DE COLETA DE OÓCITOS										Nº Coleta														
Endereço:					Proprietário:					Data da Coleta de Oócitos: 11/01/2018														
Veterinário: <u>DEGNO MARECASSA</u>					Seleção: <u>DEGNO FRANCISCO</u>																			
Nº	Touro	Raça	Doadora	RGD	Raça	Categ	P+VZ	Obs	GI	GII	GIII	Viáveis	Desn	CI	Total	Hora								
1			450	FJSP-232	vacca	NOV	VZ		-	7	18	19	7	-	20	10:43								
2			450	FJSP-232	vacca	VZ	VZ	V. B. B. P.	1	2	45	48	-	2	50	10:57								
3			475	FJSP-286		NOV	VZ		2	4	46	52	-	9	67	11:10								
4			240	FJSP-454		NOV	VZ		-	-	23	23	3	4	30	11:18								
5				FJSP-562		VACA	PT		-	7	19	20	-	2	22	11:27								
6			476	FJSP-287		NOV	VZ		-	-	39	39	7	10	50	11:40								
7			480	FJSP-292		NOV	VZ		7	7	28	30	-	5	35	11:50								
8			477	FJSP-289		NOV	VZ		5	4	83	94	-	12	106	12:14								
9																								
10																								
11																								
12																								
13																								
14																								
15																								
16																								
17																								
18																								
19																								
20																								
21																								
22																								
23																								
24																								
25																								
26																								
27																								
28																								
29																								
30																								
Doses Enviadas ao Lab		Email:		Receptoras:		Destinadas à Maturação		274																
Qtidade		Telefone:		Vitrificar		Total Viáveis		374																
Touro		Lote PBS: 02417-NVTA-CELL		DT		Destinadas ao Congelamento		0																
		Lote Heparina: vko. uve.																						

FIGURA 6 – Ficha de campo com dados da doadora, acasalamento e classificação dos oócitos.

2.4 Maturação *in vitro* (MIV)

O processo da MIV inicia quando os oócitos entram em contato com os meios de transporte (meio MIV adicionado de FSH e LH). Em cada criotubo eram armazenados 35 oócitos, em situações que uma doadora produzia mais oócitos, estes eram divididos em mais de um criotubo. Na chegada ao laboratório o mesmo técnico que selecionou os oócitos, realiza a recepção dos mesmos com a retirada dos criotubos da transportadora, acondicionando em uma raque identificada com o nome da propriedade, sendo levada a incubadora que está em uma temperatura média de 38°C (FIGURA 8).

A etapa de MIV era concluída quando atingia-se o período de 24h dos oócitos em meio MIV, contadas desde a colocação dos oócitos no criotubo acondicionados na transportadora ainda na fazenda, e posteriormente seguiriam para a realização da etapa de FIV.



FIGURA 7 – Incubadora com raques onde ficavam armazenados os Criotubos com meios MIV ao chegar das propriedades.

2.5 Fertilização *in vitro* (FIV)

A FIV caracteriza-se pela deposição do sêmen na gota de meio de fecundação onde estavam os oócitos. Esta etapa inicia-se com a identificação das placas para FIV (FIGURA 9A), com data, número das vacas e touro a ser utilizado no processo de fecundação. Após preparava-se a quantidade de meio FIV (M-FIV) que seriam utilizado no dia para todos os animais. Para isso era calculado a quantidade de M-FIV para a rotina diária, sendo adicionado e 11 μ L de heparina , 44 μ L de PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina) e 5 μ L de antibiótico pra cada mL de M-FIV. Este meio fica estabilizando na estufa por pelo menos 2 horas.

Após isso os oócitos eram transportados do meio miv para o meio FIV sendo alojados 30 oócitos/gota. Cada placa continha 6 gotas de 90 μ L de Meio FIV caso o sêmen utilizado fosse o convencional e gotas de 25 μ L caso o sêmen utilizado fosse o sexado. O preparo do sêmen levava em consideração se era sexado ou não.

Para sêmen sexado, depositava-se 400 μ L de Percoll 90% e logo acima 400 μ L de Percoll a 45%. Com o tudo pronto era descongelada a dose de sêmen de palhetas com 0,25mL, a uma temperatura de 37°C por 30 segundos e adicionava-se o sêmen no tubo sob o líquido. Após o tubo era levado a uma centrífuga a 10.000 rpm por 5 min. Após era retirado o sobrenadante e adicionado 1mL de M-FIV, realizava-se nova centrifugação a 4.000 rpm por 3 min (FIGURA 9C). Pipetava-se 90 μ L do pellet formado no fundo do tubo, por fim era este o volume usado para a fecundação. Era utilizada uma dose padrão de no mínimo 10 μ L para cada gota. Não era realizada a concentração espermática. Após adição do sêmen na gota o técnico avaliava através da lupa a motilidade e se achasse necessário aumentava a dose por gota, que no sêmen sexado geralmente era usado 10 a 15 μ L por gota.

Para o preparo do sêmen convencional, utilizava-se um tubo de 2mL adicionado de 500 μ L de Percoll a 45% no fundo 500 μ L de Percoll 90%. Com tudo pronto era descongelada a dose de sêmen de palhetas 0,25mL, a uma temperatura de 37°C por 30 segundos. Adicionava-se o sêmen no tubo e era levado a centrifuga a 9.000 rpm por 5 min. Após era retirado o sobrenadante e adicionado 1mL de M-FIV, realizava nova centrifugação a 1.000 rpm por 3min. Pipetava-se 30 μ L do pellet e diluía-se em 30 μ L de M-FIV em outro tubo, por fim era usado este volume para fecundação. Não era realizado a concentração espermática sendo o dose de 3 μ L ajustado para cada gota. O técnico avaliava através da lupa a motilidade.

Depois de realizado todo o processo de FIV as placas ficavam mantidas por 24hs em incubadora, sobre garrafas identificadas (FIGURA 9B), com temperatura e atmosfera controlada (39°C, 5% CO₂ respectivamente) e umidade saturada.

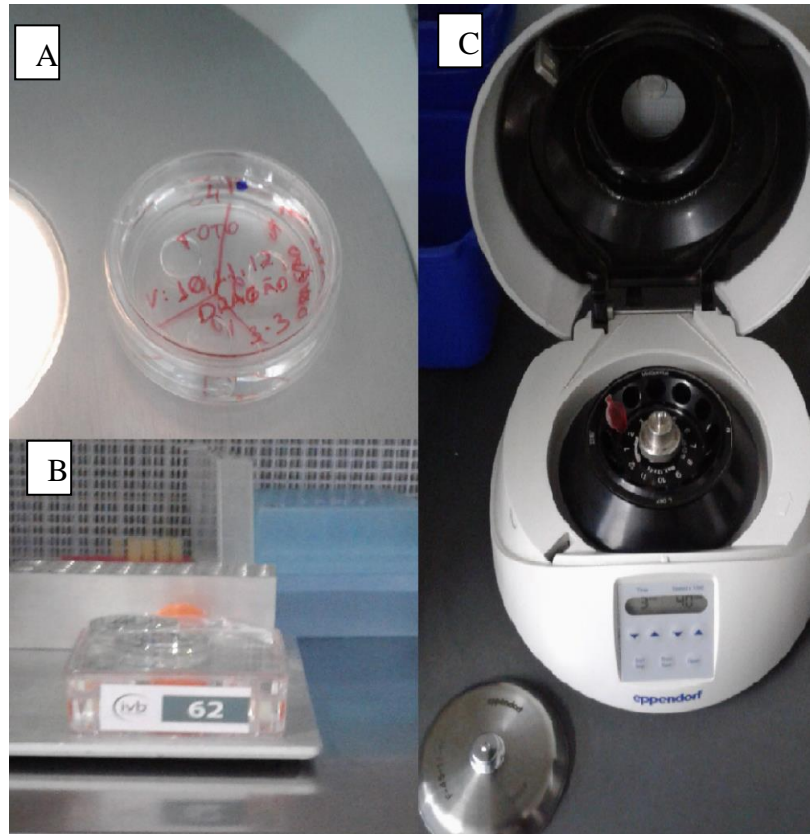


FIGURA 8 – Materiais utilizados na rotina laboratorial para o procedimento de FIV. A: placa de petri identificada para FIV; B: Garrafas identificadas onde eram acondicionadas as placas; C: Centrífuga para preparação do sêmen na FIV.

2.6 Cultivo *in vitro* (CIV)

A CIV era a etapa mais longa da PIVE. Tinha duração de 6 dias que eram contados a partir do primeiro dia do cultivo. Os protocolos de cultivo variavam conforme o padrão racial das doadoras e a logística da empresa. Antes de começar o cultivo, eram preparadas as placas de petri com as mesmas identificações da FIV e preparados os meios de cultivo que seriam utilizados no dia. A empresa tinha dois protocolos para o cultivo de seus embriões, um com meio SOF (Fluído Sintético de Oviduto) e outro com meio C4 (meio de cultivo), isto vai depender da logística que será feita para envase destes embriões produzidos.

O preparo dos meios de cultivo era realizado uma hora antes de começar o processo, pois estes ficam armazenados em incubadora a 37°C para aquecimento.

No momento do cultivo os oócitos fecundados sofriam o desnudamento que era a retirada do excesso de células do cúmulus presentes. O próximo processo consistia em preparar uma placa com três gotas para a passagem das estruturas antes de serem adicionadas ao meio de cultivo que permaneceriam, estas gotas eram compostas respectivamente de 100µL de meio-TL, 50µL de meio-TL mais 50µL de meio SOF e/ou C4 e 100µL somente do meio que seria utilizado para o cultivo. Estas estruturas eram acondicionadas em placas que ficarão em uma incubadora estritamente controlada com temperatura a 39°C e atmosfera de 5% CO₂, 5% O₂ e 90% de N₂.

No dia do cultivo era considerado o dia 1 (D1), tanto o cultivo em meio SOF quanto em meio C4, a partir daí para cada processo seguia-se um protocolo diferente. Para o meio SOF era realizado dois feeding, o primeiro no dia 3 (D3) do cultivo e o segundo no dia 5 (D5), no D3 era retirado 50% do meio SOF e adicionado novos 50% com meio SOF rico em fonte de glicose, este tem o objetivo de reestabelecer reservas energéticas dos embriões para manter o desenvolvimento. Concomitante a este processo também era realizada a taxa de clivagem gota por gota, equivalente a cada doadora. No D5 era realizado o mesmo protocolo

Quando o meio de cultivo era o C4 o protocolo consistia de uma troca de meio no D4 onde estes embriões passavam do meio C4 para o meio C5 e no D7 os embriões eram destinados ao envase ou vitrificação. Nos dois meios de cultivo era realizada a previsão de envase, onde era feita a contagem de mórulas presentes em cada gota. Assim o veterinário tinha um valor estimado de embriões que seriam transferidos no dia seguinte.

No D7 era realizado o envase, sendo priorizados os embriões nos estádios de blastocistos (BL), mas também eram envasados blastocisto expandido (Bx) e Blastocisto em eclosão (Bn) para TE a fresco.

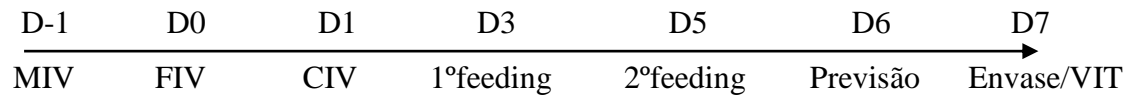
Estes embriões eram classificados previamente conforme normas estabelecidas pela IETS (2015). Esta avaliação era realizada por um técnico do laboratório com auxílio de uma lupa, sendo levado em conta a quantidade de células extrusas, blastocele bem formada, diferenciação bem evidente das células do trofoblasto e botão embrionário, porcentagem ocupada pelo embrião no espaço perivitelínico, zona pelúcida bem formada e tamanho do embrião.

Outra opção no D7 oferecida pela empresa era a vitrificação (VIT) destes embriões que também passam por avaliação do técnico do laboratório, porém para a vitrificação esta

avaliação é muito rigorosa, onde só estruturas bem formadas são vitrificadas, levando em conta todo o processo e desafios que estes embriões seriam submetidos.

Esquemas dos métodos de como eram realizados os cultivos *in vitro*.

Meio SOF:



Meio C4/C5:

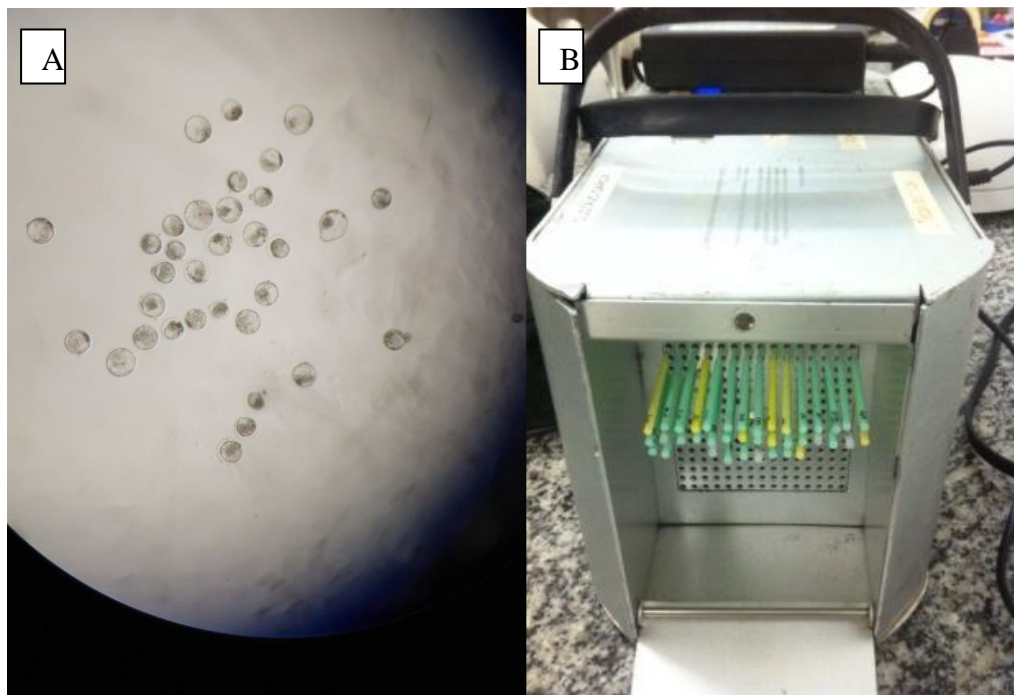
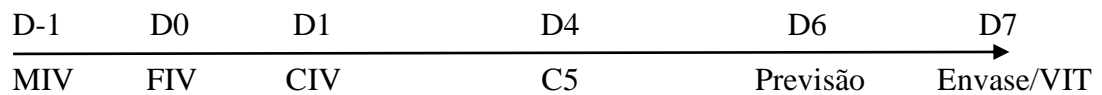


FIGURA 9 – Etapas do cultivo *in vitro* de embriões. A: Diferentes estádios de embriões; B: Transportadora com embriões já envasados com palhetas devidamente acondicionadas.

2.7 Vitrificação

Na vitrificação os embriões sofrem desidratação intensa onde boa parte do líquido intracelular era substituído por crioprotetor formando um estado vítreo. Esta troca era extremamente rápida e a temperaturas muito baixas. Em virtude disso, os embriões que eram vitrificados passavam por uma rigorosa classificação laboratorial, onde somente embriões bem formados sem células extrusas, com blastocela bem formada e zona pelúcida íntegra, eram escolhidos para o procedimento.

O protocolo de vitrificação consistia de: Numa placa NUNC, onde no Poço 1, 400 μ L de solução de manutenção, 50 μ L de DMSO e 50 μ L de etilenoglicol. No Poço 2, 300 μ L de S1M, 100 μ L de DMSO e 100 μ L de etilenoglicol. No Poço 3 e 4 colocava-se apenas 400 μ L de solução de manutenção.

Os embriões eram depositados no poço 1 onde permaneciam por 1min. Após os embriões eram adicionados no poço 2 por 20s rigorosamente cronometrados. Dentro destes 20s os embriões eram pipetados com ajuda da lupa para a extremidade de open pulled straw (OPS) que tem o formato de um bisel, era retirado o máximo de meio possível, pois este pode levar danos ao embrião. Imediatamente esta OPS é mergulhada no nitrogênio e condicionada em uma raque identificada, armazenada no botijão por tempo indeterminado.



FIGURA 10 – Processo de vitrificação dos embriões. A: Indetificação das OPS; B: Deposição dos embriões nos poços com meios de vitrificação. Fonte: In vitro Brasil.

2.8 Desvitrificação

Este procedimento era o reverso do citado acima, esta etapa consiste em retirar o embrião do estado vítrio e mantê-lo em condições adequadas para a transferência nas receptoras. A empresa apresenta uma taxa de sobrevivência de embriões desvitrificados de 80 a 85% em média, e uma taxa de prenhes de 33 a 35% em média.

O processo iniciava com o aquecimento dos meios previamente preparados e com auxílio da placa NUNC de 4 poços. No poço 1 era colocado 400 μ L de solução de manutenção e 200 μ L de solução SM. No poço 2 era utilizado os mesmos meios com as mesmas quantidades do poço um, no poço 3 colocava-se 400 μ L de solução de manutenção e 100 μ L de solução SM e no poço 4 coloca-se somente 400 μ L de solução de manutenção.

Mergulhava-se a ponta da OPS no meio do poço 1 e com ajuda da lupa acompanhava-se a decida dos embriões da OPS. Após os embriões eram pipetados para o poço 2 onde permaneciam por 5 min para. E finalmente eram transferidos para o poço 3 onde permaneciam por mais 5 min. Somente depois desses processos os embriões eram passados para o poço 4 onde permaneciam até o envase em palhetas de 0,5mL com meio HSOF.

2.9 Transferência embrionária em tempo fixo (TETF)

Esta etapa muitas vezes é uma das últimas feitas pela equipe da empresa, pois muitos produtores realizam o diagnóstico através de um técnico particular. Este processo também chamado de inovulação embrionária começa no laboratório com o envase dos embriões.

Os veterinários saiam do laboratório com todos os embriões envasados, acompanhado pelas fichas laboratoriais devidamente preenchidas. Nestas fichas contiam a descrição do acasalamento e os estágios que cada embrião foi envasado.

O envase era realizado por um técnico do laboratório da seguinte forma: com o auxílio da lupa, este aspira com uma palheta de 0,5mL meio HSOF, ar e meio com embrião (FIGURA 12).

Lacre	HSOF	Ar	HSOF	Ar	Embrião + HSOF	Ar	HSOF	Ar	HSOF
--------------	-------------	-----------	-------------	-----------	-----------------------	-----------	-------------	-----------	-------------

FIGURA 11 - Sequência de envase dos embriões na palheta de 0,5mL.

Após estas palhetas eram devidamente acomodadas em uma transportadora de embrião com temperatura de 36°C e desta forma levados a propriedade. Na propriedade o Médico Veterinário avaliava as receptoras sincronizadas uma a uma através de palpação transretal, Neste momento o mesmo vai classificar esta receptora como apta ou não a receber o embrião, a principal estrutura avaliada é o ovário e se este tem a presença de CL, pois sem essa estrutura é inviável esta receptora manter uma gestação. Este CL é classificado em uma escala que vai de 1 a 3 conforme seu tamanho, 1-CL com leve proeminência à palpação e massa pequena vista através de imagem ultrassonografica, 2-CL proeminente, porém discreto à palpação e massa moderada visto pela ultrassonografia transretal, 3-CL bem proeminente a palpação com grande massa vista pelo exame de ultrassonografia transretal, levando em conta que quanto maior o CL maior a produção de progesterona, esta responsável por manter a gestação.

Nas fêmeas com CL era realizada a TE da seguinte forma, tricotomia na região sacrococcígea, a assepsia com álcool 70% e realizada a anestesia epidural.

Concomitantemente era preparado o inovulador, pelo auxiliar, com a palheta de 0,5mL com o embrião, bainha e a camisinha sanitária e entregue ao técnico. O veterinário irá introduzir o inovulador via transvaginal e com a mão oposta localizar a cérvix via transretal, após a passagem do primeiro anel a camisinha era rompida evitando levar contaminação para dentro do útero. Prossegue com cuidadosa passagem da cérvix, quando chega ao corpo do útero ele direciona o inovulador para o corno uterino ipsilateral do ovário que tem a presença do CL, e deposita o embrião o mais cranialmente possível.

Todas as informações são anotadas na ficha laboratorial, juntamente com identificação da receptora, o embrião que foi inovulado e a classificação do CL dada pelo veterinário. Ao término do serviço era orientado a proprietário realizar um manejo diferenciado para estas receptoras, evitando trazer para o curral, fornecendo pasto de qualidade e não provocando estresse.

TABELA 3 – Média mensal de produção de embriões. Fonte: In Vitro Brasil S/A

Descrição da atividade	Produção Embriões
Fresco	10.000
Vitrificado	6.000
Total	16.000

2.10 Diagnóstico de gestação (DG)

O DG era realizado em duas etapas, a primeira aos 23 dias e a segunda aos 60 dias após a TE. Para estabelecer estas datas os veterinários levavam em consideração a idade embrionária, ou seja, no dia da T.E o embrião estava com 7 dias de desenvolvimento, então a equipe retorna à propriedade para realizar o DG aos 30 dias do desenvolvimento embrionário. As receptoras iam sendo presas no tronco de contenção, e o Médico Veterinário realizava primeiramente fazia uma avaliação ginecológica e após a palpação transretal com ajuda do ultrassom, dando assim o diagnóstico de prenhe ou vazia.

A sequência de palpação era realizada da seguinte forma, primeiro percorrendo os dois cornos uterinos para ver se tem ou não a presença de líquido amniótico/presença do embrião e após avaliados os ovários para observar a presença de CL, também avaliava-se a assimetria dos cornos. Durante os diagnósticos eram anotados em uma ficha de controle o número de cada receptora, para que na próxima visita pudesse ser calculado a taxa de perda embrionária e o número de receptoras que retornavam para a sexagem fetal.

O DG era realizado também em doadoras no dia da OPU, pois doadoras com prenhez muito adiantadas, mais de 4 meses, os veterinários não realizavam a aspiração por motivos de não ser possível posicionar os ovários e por levar riscos a saúde gestacional da doadora. Já o DG no D0 do protocolo de sincronização das receptoras tem a finalidade de descartar as vacas que já estão prenhes.

Nestas avaliações era considerada a categoria das receptoras, sendo estas novilhas, vacas solteiras, vacas paridas e multíparas. O padrão racial era levado em consideração, tendo em vista que cada raça tinha particularidades de tamanho e consistência uterina. A empresa

trabalha com uma estimativa de taxas de prenhes de embriões fresco na média de 45% e desvitrificados em média de 35%.

TABELA 4 – Porcentagem da taxa de Prenhez de embriões transferidos a fresco e desvitrificados em experimento realizado pela empresa na Fazenda Santa Luzia/MG, cliente IVB. Fonte: In Vitro Brasil S/A.

Descrição da atividade	Embriões transferidos	Taxa de Prenhez 30 dias de gestação
Embriões frescos	259	51,4%
Embriões desvitrificados	234	34,5%
Total	493	85,9%

2.11 Sexagem Fetal por Ultrassonografia / Confirmação de Prenhez

Esta era a ultima etapa do DG e finaliza o processo da PIVE. Ainda possibilitava que os resultados de todo o serviço prestado podiam ser tabulados e organizados para expressar os índices de produção da empresa.

A sexagem era realizada através do auxílio de ultrassom onde eram feitas várias imagens do feto para a identificação da posição do tubérculo genital. Este exame era preconizado pela empresa para ser realizado no D60 de gestação. Devido a logística e as distâncias das fazendas este exame podia ser adiado sendo realizado até os 90 dias de gestação.

Durante o exame ultrassonográfico tentava-se posicionar o feto de forma que pudesse ser observado a posição do tubérculo genital (FIGURA 11). Quando esta estrutura apresentava-se em sentido caudal próxima a cauda do feto e entre os membros pélvicos era diagnosticado como fêmea. Já os machos este tubérculo ficaria posicionado na região ventral próximo ao cordão umbilical do feto. Ao fim os números eram apresentados ao proprietário como a conclusão do serviço.

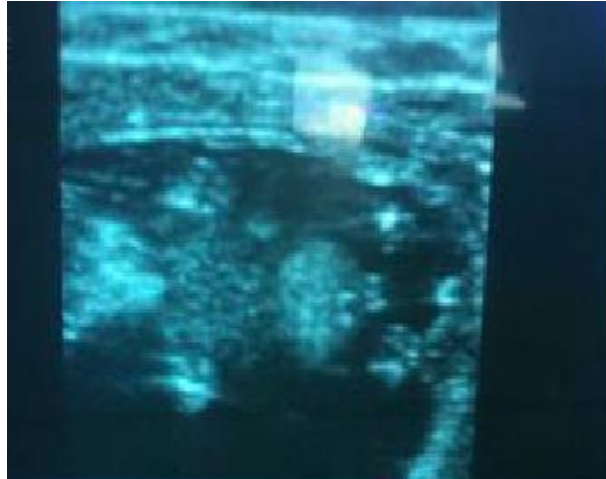


FIGURA 12 – Imagem ultrassonográfica realizada para confirmação de prenhes aos 60 dias com a evidência do tubérculo genital para a sexagem fetal de um macho.

3 – DISCUSSÃO

3.1 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

Ultimamente a PIVE vem sendo usada para auxiliar no crescimento que os desafios da produtividade vem mostrando, como a sustentabilidade da produção, reprodução e sanidade dos rebanhos atualmente (CHOUDHARY et al., 2016). A PIVE vem sendo uma ferramenta utilizada para aumentar a disseminação do alto potencial genético de fêmeas bovinas e melhorar a qualidade tanto na produção de carne quanto produção leiteira (SILVA A., et al., 2015).

Nos bovinos a PIVE é uma etapa que consiste em maturação de oócitos, fertilização de oócitos e cultivo *in vitro* de embriões, onde sabe-se que 30-40% desses embriões chegam ao estágio de blastocisto, para transferência ou congelamento (LONERGAN, 2007).

Na rotina do laboratório da empresa realizava-se, as etapas de OPU, MIV à campo, dentro das propriedades, e junto a esses as etapas de FIV e CIV, e era finalizado o serviço com o diagnóstico de gestação desses embriões transferidos.

3.2 Seleção de doadoras e receptoras

O processo de seleção de doadoras e receptoras é uma das etapas mais importantes na hora de montar um programa de produção *in vitro* de embriões. Se estas não estiverem aptas reprodutivamente e com ECC bom, com certeza a técnica não vai obter sucesso, por isso a importância de uma avaliação criteriosa.

A seleção das doadoras era realizada durante visitas técnicas nas propriedades atendidas pela IVB. Os critérios de seleção estavam pautados da condição geral do animal, saúde genital e uterina, ausência de anormalidades ovarianas, estado gestacional, tipo racial, valor zootécnico e produção leiteira.

Em relação a condição geral da doadora para se ter melhores taxas de recuperação oocitária e produção embrionária era importante que esta fêmea tinham um ECC superior a 3 (GRIMARD et al., 2013). Durante o estágio curricular os veterinários da IVB aspiravam vacas com ECC variado. Isso impactava diretamente na recuperação.

A saúde reprodutiva da doadora esta relacionada com sua saúde nutricional fator que influencia na qualidade dos oócitos recuperados na técnica de OPU. Esta não devia apresentar nenhuma patologia reprodutiva durante o exame ginecológico, principalmente se for de cunho genético que possa ser transmitido a progênie. O histórico reprodutivo da doadora deve ser analisado, e não deve constar nenhuma característica indesejável. Estas doadoras geralmente tem valor genético e devem apresentar intervalos regulares de ciclicidade (ALBERIO, BUTLER 2001).

Estas fêmeas devem estar livres de qualquer doença infecciosa relacionada a reprodução como brucelose, IBR, leptospirose, dentre outras. Pois isto impacta diretamente em sua progênie, disseminando estas patologias em grande número e afetando o sucesso da TE (JUNQUEIRA, ALFIERI, 2006).

Dentro da rotina da empresa IVB, os médicos veterinários buscavam trabalhar com doadoras livres de alterações patológicas reprodutivas e orientavam para que os produtores realizassem as vacinas para enfermidades infectocontagiosas que pudessem interferir no resultados de produção. Porém não havia um controle mais rigoroso deste processo. Uma grande população folicular era necessária para se obter uma maior quantidade de oócitos de qualidade e viáveis, para isto é necessário avaliação da condição ovariana destas doadoras. Aderências e tamanho dos ovários são fatores que impactam negativamente na realização da técnica da OPU, levando a recuperação de oócitos com baixa quantidade (LOONEY et al., 1994).

A realização do DG das doadoras deve ser feito sempre antes da realização da técnica da OPU, pois gestação muito avançadas prejudicam o sucesso da técnica e também o bem estar uterino desta fêmea. A manipulação do útero e ovários causam lesões que levam ao aumento da produção de prostaglandina, podendo levar ao aborto (BOOTH, MCDONALD, 1992). O DG era realizado em todas as doadoras por Médicos Veterinários da empresa IVB, e somente eram aspiradas fêmeas com gestação menor a 4 meses, e sendo possível a manipulação via transretal dos ovários.

Na seleção de receptoras deve ser levado em conta sua idade, saúde reprodutiva, condição e tamanho corporal, ciclo estral regular e disposição racial (ALBERIO, BUTLER, 2001).

As receptoras são fêmeas de baixo valor genético, porém deviam apresentar algumas características, como habilidade materna, boa fertilidade e adaptação ao clima. O controle de doenças reprodutivas devia ser muito bem avaliado para esta categoria.

A manutenção de receptoras aptas para programas de TE representam os maiores custos dentro do processo da PIVE. Sendo, sem dúvida, um grande entrave para a aplicação da técnica (ALBERIO, BUTLER 2001).

A utilização de novilhas como receptoras pode ser uma opção, porém estas devem passar por uma avaliação ginecológica. Novilhas podem ser consideradas aptas para receberem um embrião se tivessem a presença de corpo lúteo (BARUSELLI et al., 2000). As novilhas apresentam taxas de prenhez superiores a vacas múltiparas, porém estas apresentam mais problemas ao parto e de lactação levando assim a resultados inferiores (ALBERIO; BUTLER 2001).

Vacas múltiparas eram melhores opções para receptoras de embrião, pois elas já apresentam um histórico reprodutivo e de partos, assim podiam ter uma melhor garantia de gestação saudável e habilidade materna para manter seu produto, porém estas deviam responder devidamente ao protocolo de sincronização e não apresentarem patologias reprodutivas.

As receptoras deviam estar em uma ótima condição corporal e serem selecionadas conforme a raça do embrião que será inovulado, pois o peso ao nascimento era determinado geneticamente. Por isso deve-se transferir embriões que serão mais pesados ao nascer em receptoras com pré-disposição racial para manter terneiros maiores, assim teriam menos riscos de problemas ao parto. Estas devem receber nutrientes suficientes para que possa criar o terneiro e este consiga expressar seu valor genético (ALBERIO, BUTLER 2001). A seleção de receptoras era realizada pela equipe da IVB, por técnicos experientes. Estes realizam a avaliação visual da receptora, levando em conta se estas eram novilhas ou vacas múltiparas, realizavam o exame ginecológico para descartar problemas reprodutivos e confirmar se estas fêmeas estavam ciclando para serem selecionadas ao protocolo de sincronização. Os veterinários orientavam os produtores a fornecer sal mineral para reprodução para o lote das receptoras.

3.3 Protocolos de Sincronização Doadora/Receptora

Os protocolos de OPU vistos durante o estágio eram realizados em momento aleatório do ciclo estral. HENDRIKSEN et al., (2004) observaram que melhores taxas de recuperação de oócitos foram observadas quando as doadoras foram aspiradas no início da emergência da

onda folicular. Folículos que estão em graus de atresia apresentam oócitos de qualidade inferior. Protocolos hormonais para sincronização de doadoras e indução da emergência folicular podem ser utilizados e facilitam a aplicação de biotecnologias da reprodução (BÓ et al., 2002). Inúmeros protocolos são realizados para controlar a fase do ciclo estral das doadoras para obter maior sucesso na OPU, como aplicações de prostaglandina, FSH, eCG para sincronizar uma nova onda folicular (SIRARD, 2012). Durante todos os protocolos de OPU acompanhados no ECSMV não foi observada nenhuma técnica de sincronização da onda folicular. Já a sincronização de receptoras de embriões consistia na observação de cio e protocolos hormonais. O protocolo P36 consiste na aplicação de hormônios em três manejos com o objetivo de sincronizar a ovulação de fêmeas e apresenta resultados satisfatórios (BARUSELLI *et al.*, 2006).

A aplicação do implante de progesterona (P4) no D0 tinha finalidade de inibir o pico de hormônio luteinizante (LH) e consequente ovulação, já a aplicação de 2 mL de benzoato de estradiol (BE) intramuscular (IM) tinha função de promover atresia folicular e iniciar uma nova onda folicular, que ocorria por volta do dia 3 (D3) do protocolo hormonal. No D8 era retirado implante de P4 e aplicado 2 mL de PGF2 α IM, com a função de realizar luteólise e diminuir níveis de P4 circulante favorecendo um aumento gradual de LH até o seu pico. O cipionato de estradiol (CE) era administrado também no D8 com finalidade de estimular a liberação de LH pelo *feedback* positivo sobre GnRH. No D17 era realizada a TE.

Para ter melhor aproveitamento das receptoras a IVB utilizava suplementação hormonal de eCG com a finalidade de melhorar as taxas de concepção das receptoras. Estudos apontaram efeitos positivos de eCG em protocolos de TETF demonstrando um aumento nas taxas de aproveitamento das receptoras (BARUSELLI et al., 2004). Esta gonadotrofina era bastante utilizada em protocolos de TETF para receptoras, pois tem o objetivo de promover um crescimento final ao folículo dominante e aumentar o diâmetro do CL formado (BO et al., 2006).

Os Médicos Veterinários da IVB realizavam o protocolo de sincronização de receptoras conforme preconizado por BARUSELLI et al., (2006). Na experiência prática dos veterinários da IVB, o proprietário era sempre orientado a realizar a adição de eCG com a justificativa de que melhora o aproveitamento das receptoras e também melhora as taxas de prenhes. Estudos mostraram que a aplicação do eCG em fêmeas, melhoraram sua resposta ovulatória (RIBAS, 2017).

3.4 Aspiração folicular Guiada por ultrassonografia

Existem fatores mecânicos e biológicos que interferem na produção oocitária e embrionária, como diâmetro da agulha, pressão de aspiração, operador, momento do ciclo estral, Escore de Condição Corporal e a estimulação do crescimento folicular.

Dentre eles destaca-se a raça, clima, nutrição, fase do ciclo estral que a doadora se encontra, calibre de agulha e pressão exercida pela bomba de vácuo (MELLO et al., 2016). Estes são fatores que interferem diretamente na quantidade e qualidade dos oócitos recuperados (BARUSELLI et al., 2015).

A disposição racial da doadora impacta diretamente na recuperação de oócitos, sabe-se que raças *Bos taurus* quando comparadas a *Bos indicus* apresentam menores taxas de recuperação. Raças *Bos indicus* recrutam folículos menores (5mm) e em maior quantidade (PONTES et al., 2011).

No período de estágio a empresa realizava aspiração em grande quantidade de doadoras. Estas fêmeas, eram na grande maioria, *Bos indicus* e apresentavam uma grande quantidade de folículos. Em algumas ocasiões eram aspiradas doadoras meio sangue (girolando). A população oocitária destas fêmeas geralmente era maior e apresentava uma maior taxa de recuperação.

Outros fatores ainda podem interferir na qualidade dos oócitos. Dentre estes, destaca-se a condição nutricional da fêmea e também o estresse térmico. Rocha et al., (1998), ao aspirar vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* durante o verão, verificaram que os oócitos recuperados das vacas taurinas foram de baixa qualidade não produzindo embriões. Porém esta influência não foi verificada em vacas zebuínas. Durante o estágio, a questão climática não era levada em conta pela empresa IVB. Assim vacas taurinas eram aspiradas embora a produção embrionária fosse um pouco menor. Esta prática era preconizada devido a alta demanda comercial.

A questão nutricional era sempre levada em consideração na hora de se realizar um programa de aspiração folicular. DISKIN et al., (2003) relatam a importância de um balanço energético positivo para um desenvolvimento folicular e oocitário. Porém o excesso ou a falta de nutrição afeta a fertilidade, causada pelo balanço energético negativo das doadoras (CHAGAS et al., 2007). Em serviços prestados pela empresa IVB os técnicos sempre buscavam doadoras com ECC 3, porém por motivos de produção e acordo/contrato com o proprietário era realizada a OPU em doadoras de escores variados.

A nutrição está diretamente ligada à regulação da vida reprodutiva das fêmeas, tanto para a manutenção da gestação quanto para a ciclicidade. Fêmeas com ECC muito baixo geralmente se apresentam em anestro ou não tem suporte para levar uma gestação a termo.

O ciclo estral é o fator que mais interfere sobre o sucesso da OPU, pois este influencia no tamanho folicular, e conseqüentemente na taxa de recuperação dos oócitos, qualidade e produção embrionária (CHAUBAL et al., 2006). A melhor fase do ciclo estral para um bom resultado na aspiração é no período entre a emergência de uma onda folicular e antes da dominância folicular. Ocasão onde se encontra maiores folículos para serem aspirados (GINTHER et al., 1996). Porém no período de estágio as doadoras aspiradas não sofreram nenhum protocolo hormonal para sincronização, devido a logística e a alta produção que a empresa mantém.

Outros fatores mecânicos influenciam na recuperação oocitária, o calibre da agulha acoplada ao mandril e a pressão exercida pela bomba de vácuo no sistema. Estudos mostram a relação entre a pressão por mmHg e diferente tamanhos de agulha. A melhor relação de pressão e calibre de agulha mostrou-se entre 90-110mmHg com uma agulha de calibre 18G, onde apresentou maior porcentagem de oócitos recuperados com maior porcentagem de células do cúmulus e maior produção de embriões em estádios de blastocisto. Estudos mostraram também a influencia da largura do bisel da agulha para aspiração, onde um bisel mais largo apresentou uma maior porcentagem de oócitos desnudos (BOLS, 2001).

Portanto o calibre da agulha, a pressão exercida pela bomba de vácuo e a largura do bisel tem grande importância na prevenção do desnudamento das células do cúmulus que rodeiam as estruturas recuperadas. Dentre os procedimentos de OPU acompanhados no estágio, os Médicos veterinários da empresa realizavam a aspiração com uma agulha de calibre 18G de bisel curto. Sempre buscavam manter uma pressão da bomba de vácuo entre 90-110mmHg, porém esta pressão era variável e muitas vezes aumentada para destravar o sistema podendo levar a uma alta taxa de oócitos desnudos.

4 – CONCLUSÃO

As pesquisas na área de tecnologia da reprodução estão em grande expansão através do desenvolvimento e emprego de novas biotecnologias, com a possibilidade de aplicação prática em larga escala, em vários setores da pecuária brasileira. Dentro deste contexto o Médico Veterinário está inserido para o melhoramento e aplicação dessas técnicas, especificamente a produção *in vitro* de embriões, onde este pode atuar em todas as etapas inclusas nesse processo.

Com base no conhecimento adquirido durante a graduação e no ECSMV, pude acompanhar diversas etapas da PIVE sendo possível melhorar meu embasamento teórico e prático. Tive a oportunidade também de adquirir novos conhecimentos e ampliar minha rede de contatos através da grande rotina realizada na empresa, onde pude conhecer todo o Brasil e seus mais diversos rebanhos com variadas produções pecuárias. Destaca-se as etapas da PIVE realizadas a campo que foi a maior parte que pude acompanhar dentro do período de estágio, onde tive meu primeiro contato com uma rotina intensa e de larga escala na produção de embriões *in vitro*.

O estágio na IVB me oportunizou várias experiências e conhecimento para meu crescimento profissional, onde superou todas minhas expectativas relacionadas ao estágio.

REFERÊNCIAS

- ALBERIO R; BUTLER H. Sincronización de los Celos en Hembras Receptoras. In: PALMA, Gustavo A Palma. **Biología de la Reproducción**. INTA, 2001. p. 61-77.
- BARUSELLI P.S.; REIS E.L.; MARQUES M.O.; NASSER L.F.; BÓ G.A. The use of hormonal treatment to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.77-88, 2004.
- BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T.; VALENTIM, R.; BERBER, R.C.A.; CARVALHO FILHO, A.F.; MADUREIRA, E.H.; COSTA NETO, W.P. Aumento da taxa de prenhez em receptoras de embrião bovino pela utilização do protocolo “ovsynch” com inovulação em tempo fixo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 28, p. 216, 2000.
- BARUSELLI, P.S.; VIEIRA, L.M.; BATISTA, E.O.S.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; GIMENES, L.U.; TORRES-JUNIOR, J.R.S.; MARTINS, C.M.; SÁ FILHO, M.F.; BÓ, G.A. Updates on embryo production strategies. **Animal Reproduction**, v.12, p.375-82, 2015.
- BARUSELLI, P.S.; DE SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; NASSER, L.F.; NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M.; BÓ G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.65, p.77-88, 2006.
- BOOTH, N.H.; MCDONALD, L.E. *Farmacologia e Terapêutica em Veterinária*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, Cap. 23, p. 363-367, 1992.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R., TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R.J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 53-72, 2002.

BÓ G.A.; BARUSELLI P.S.; CHESTA P.M.; MARTINS C.M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*, v.65, p.89-101. 2006.

BOLS, EJ. Punción Folicular (OVUM PICK-UP, OPU) En La Vaca. In: PALMA, Gustavo A Palma. **Biotecnología de la Reproducción**. INTA, 2001. p. 185-224.

CHAGAS, L.M.; BASS, J.J.; BLACHE, D.; BURKE, C.R.; KAY, J.K.; LINDSAY, D.R.; LUCY, M.C.; MARTIN, C.B.; MEIER, S.; RHODES, F.M.; ROCHE, J.R.; THATCHER, W.W.; WEBB, R. Invited review: new perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.4022-32, 2007.

CHAUBAL, S. A.; MOLINA, J. A.; OHLRICH, C. L.; FERRE, L. B.; FABER, D. C.; BOLS, P. E.; RIESEN, J. W.; TIAN, X.; YANG, X. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. **Theriogenology**, v. 65, p. 1631-48, 2006.

CHOUDHARY, K. K.; KAVYA, K. M.; JEROME, A.; SHARMA R. K. Advances in reproductive biotechnologies, **Veterinary World**. 9(4): 388-395. 2016.

DISKIN, M.G.; MACKEY, D.R.; ROCHE, J.F.; SREENAN. J.M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.345-70, 2003.

GRIMARD B.; MARQUANT-LEGUIENNE B.; REMY D.; RICHARD C.; NUTTINCK F.; HUMBLOT P.; PONTER AA. Postpartum variations of plasma IGF and IGFbps, oocyte production and quality in dairy cows: relationships with parity and subsequent fertility. **Reproduction Domestic Animal**, v.48, p.183-194, 2013.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology Reproduction**, v. 55, p. 1187-94, 1996.

HENDRIKSEN, P.J.M.; STEENWEG, W.N.M.; HARKEMA, J.C.; MERTON, J.S.; BEVERS, M.M.; VOS, P.L.A.M.; DIELEMAN, S.J. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 6, p. 909, 2004.

IETS. 2015 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals, **25th annual report on the data collected globally during 2016 for embryo transfer (ET) activity in 2015**.

IN VITRO BRASIL, Notícias, disponível em: <http://invitrobrasil.com.br/noticias/2013/09/24-in-vitro-multiplica-rebanhos-na-russia.php>, acessado em 17/05/2018.

JUNQUEIRA JR; AMAURI A. ALFIERI. Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. **Sistema de Información Científica**, v. 27, n. 2, p. 289-298, 2006.

LOONEY, C.R.; LINDSEY, B.R.; GONSETH, C.L.; JOHNSON, D.L.; Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows, **Theriogenology** v.41 p.73, 1994.

LONERGAN P. State-of-the-art embryo technologies in cattle. **Soc. Reprod. Fertil. Suppl.** 64:315-25. 2007.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA¹, J. E.; SOUSA, S. L. G.; MELLO, M. R. B., PALHANO, H. B. *In vitro* embryo production in cattle. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.40, n.2, p.58-64, abr./jun. 2016.

PONTES, J. H.; MELO STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, p. 1640-6, 2011.

RIBAS, **Gonadotrofina Coriônica Equina (ecg) na superestimulação ovariana prévia a OPU em vacas braford: efeito sobre o crescimento folicular e na cinética de fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro* 2017.** Disponível em: <<http://cursos.unipampa.edu.br/cursos/ppgca/2017/03/20/dissertacoes-2017/>>, acessado em 05/06/2018.

ROCHA, A.; RANDEL, R.D.; BROUSSARD, J.R.; LIM, J.M.; BLAIR, R.M.; ROUSSEL, J.D.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v.49, p.657-65, 1998.

SAATH, K. C. O. & FACHINELLO, A. L. Crescimento da demanda de alimentos e as limitações do fator terra no brasil, disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/168097>>, acesado 15/04/2018.

SILVA, J. S.; BORGES, L. S.; MARTINS, L. E. L. L.; LIMA, L. A.; BARBOSA, Y. G. S.; SILVA, N. A.; Brito, T. K. P. Aspectos comerciais da transferência de embriões e fertilização *in vitro* em bovinos – revisão. **Nutri Time**, Revista Eletrônica, Vol. 12, Nº 05, set/out de 2015.

SIRARD, M. A. Factors affecting oocyte and embryo transcriptomes. **Reproduction Domestic Animal**. v.47, p.148-55, 2012.

SILVA, A. P. T. B.; MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; MELLO, M. R. B. Efeito do acasalamento entre a doadora e o touro (Holandês versus Gir) na produção *in vitro* de embriões bovinos. **B Anim Husb**, v.72, p.51-58, 2015.

ANEXO A

