



FÁBIO DE PÁDUA ALMEIDA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA EMPRESA ABS/IVB
TECHNOLOGIES UNIDADE DE MOGI MIRIM –SP**

LAVRAS - MG

2019

FÁBIO DE PÁDUA ALMEIDA

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA EMPRESA ABS/TVB
TECHNOLOGIES UNIDADE DE MOGI MIRIM –SP**

Relatório de estágio supervisionado apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Medicina Veterinária para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. José Camisão de Souza, Ph.D.

Orientador

LAVRAS - MG

2019

*Dedico este trabalho ao
meu avô Manoel (in memoriam) que sempre foi minha fonte de
inspiração para que me tornasse veterinário!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre iluminar meu caminho e me dar forças para continuar em frente.

Aos meus pais, Denis e Valéria, por nunca pouparem esforços para que eu pudesse me formar.

Ao meu irmão, Diogo, pelo companheirismo.

À Universidade Federal de Lavras, que sempre sonhei em ser um aluno desta instituição.

Aos professores dos Departamentos de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Ao Prof. José Camisão, por sempre me orientar e ensinar cada dia mais.

Ao Grupo de Estudos em Reprodução, que foi de grande importância para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos irmãos da República Sem Porteira, por serem minha família em Lavras.

À toda equipe da ABS PECPLAN, que foi muito importante para minha formação técnica e pessoal.

Muito obrigado!

RESUMO

Com a crescente demanda mundial por proteína de origem animal, a pecuária moderna precisa ser cada vez mais eficiente e produtiva. As biotecnologias da reprodução utilizadas em escala comercial, como a inseminação artificial, produção *in vitro* de embriões, transferência de embriões e criopreservação, tem um papel importantíssimo na pecuária eficiente, pois aumenta o ganho genético em um reduzido intervalo de tempo, intensifica o melhoramento genético dos rebanhos, tornando a atividade mais produtiva e lucrativa. Com o auxílio de projetos de extensão rural, as biotecnologias que antes eram restritas à pecuária de gado elite, hoje, tornaram-se uma realidade para o pequeno produtor, que pode comprar prenhez de animais geneticamente superiores a um valor bem mais acessível. O objetivo deste trabalho foi relatar as atividades desenvolvidas durante o estágio supervisionado na empresa ABS/IVB Technologies unidade de Moji Mirim – SP. Durante o estágio, objetivou-se aprimorar os conhecimentos adquiridos durante a graduação e desenvolver habilidades profissionais na área de reprodução de bovinos.

PALAVRAS-CHAVE: Reprodução. Biotecnologia. Embriões.

ABSTRACT

With the growing worldwide demand for animal protein, modern livestock farming needs to be increasingly efficient and productive. Commercially used reproductive biotechnologies, such as artificial insemination, in vitro embryo production, embryo transfer and cryopreservation, play an important role in animal husbandry, as they increase the genetic gain in a short time, enhance the genetic improvement of the herds, making the activity more productive and profitable. With the help of rural extension projects, biotechnology, once restricted to elite livestock, has now become a reality for the small farmer who can buy genetically superior baby animals at a much more affordable value. The objective of this work was to report the activities developed during the supervised internship at the ABS / IVB Technologies unit of Moji Mirim - SP. During the internship, the objective was to improve the knowledge acquired in the undergraduate and to develop professional skills in the field of bovine reproduction.

KEYWORDS: Reproduction. Biotechnology. Embryos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Prédio da unidade de Mogi Mirim – SP.....	10
Figura 2 – Escritório.....	11
Figura 3 – Laboratório.....	11
Figura 4 – Estoque de sêmem/embriões e sala de campo	11
Figura 5 – Esquema do protocolo de sincronização, dia da OPU, FIV e TETF	14
Figura 6 – Equipamento completo de aspiração folicular (OPU)	15
Figura 7 – Laboratório de seleção montado na Fazenda Três Marias em Rondonópolis – MT	16
Figura 8 – Material para TETF na Agropecuária GV5, município de Poço Fundo – MG.....	17
Figura 9 – Lote de receptoras submetidas a diagnóstico de gestação no município de Inocência – MS	18
Figura 10 – Sexagem fetal de macho. Seta preta: cordão umbilical; seta vermelha: tubérculo genital	18
Figura 11 – Diagnóstico de gestação com aproximadamente 30 dias.....	19
Figura 12 – Gráfico da relação ECC e taxa de prenhez aos 30 dias (Diag. 01).	21
Figura 13 – Gráfico da distribuição das prenhez de acordo com o ECC.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividades desenvolvidas durante o estágio supervisionado de acordo com o número de animais.....	14
Tabela 2 – Relação raça da receptora/taxa de prenhez aos 30 dias.	21
Tabela 3 – Relação dispositivo de progesterona/taxa de prenhez aos 30 dias.....	22
Tabela 4 – Relação do eCG utilizado com a taxa de prenhez aos 30 dias.....	23

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	DESCRIÇÃO DO LOCAL E PERÍODO DE ESTÁGIO	11
2.1	SUPERVISÃO DO ESTÁGIO.....	13
3	ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	14
3.1	SELEÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DE RECEPTORAS	14
3.2	ASPIRAÇÃO FOLICULAR OU OPU (OOCITUM PICK UP).....	15
3.3	TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (TE).....	17
3.4	DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO E SEXAGEM FETAL	18
4	ANÁLISES DO BANCO DE DADOS DO SERVIÇO DE TETF DA EMPRESA ABS/IVB TECHNOLOGIES	21
4.1.	MATERIAL E MÉTODOS	21
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
	REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

Com a crescente demanda mundial por proteínas de origem animal como carne e leite, a necessidade de maior eficiência produtiva é uma realidade. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017), no primeiro trimestre de 2017, foram abatidas 7,37 milhões de cabeças de bovinos e 5,87 bilhões de litros de leite foram adquiridos pelos laticínios, ambos dados provenientes de estabelecimentos com algum tipo de serviço de inspeção sanitária. Mesmo ocupando lugar de destaque na pecuária mundial, o cenário nacional ainda possui baixos índices produtivos e reprodutivos. Com isso, o uso de biotecnologias da reprodução, aliado ao bom manejo nutricional e sanitário, são alternativas para se obter maior produtividade e eficiência reprodutiva.

As técnicas de inseminação artificial e transferência de embriões em tempo fixo, aliadas ao uso de sêmen sexado de touros provados, possibilita um maior ganho genético em um reduzido intervalo de tempo, promovendo melhoramento genético e otimizando resultados.

O Brasil é líder mundial na produção *in vitro* (PIVE) de embriões bovinos. Essa técnica possui um maior potencial de multiplicação quando comparada a produção *in vivo*, pois aumenta consideravelmente o número de produtos/vaca/ano, além de permitir uso de bezerras pré-púberes, vacas gestantes, vacas com subfertilidade adquirida e vacas senis. A pesquisa e desenvolvimento das técnicas de produção de embriões são de suma importância para obtenção de melhores resultados e maior uso em escala comercial.

O objetivo foi descrever as atividades desenvolvidas a campo durante o estágio supervisionado, na empresa ABS/IVB Technologies, na cidade de Mogi Mirim SP, no período de janeiro a maio de 2019.

2 DESCRIÇÃO DO LOCAL E PERÍODO DE ESTÁGIO

O estágio supervisionado foi realizado no setor de campo da empresa ABS/IVB Technologies, unidade de Mogi Mirim - SP. A empresa iniciou suas atividades em 2002 como In Vitro Brasil S/A e a partir daí veio se destacando no mercado da PIVE, se tornando uma das maiores empresas de produção de embriões *in vitro* do mundo. Em 2015, o grupo britânico Genus adquiriu 51% das ações da IVB e, em 2018, houve a completa incorporação ao grupo, se tornando ABS Pecplan.

Atualmente, a empresa conta com três laboratórios no Brasil, localizados nas cidades de Uberaba-MG, Mogi Mirim-SP e Xinguara-PA. A unidade de Mogi Mirim-SP (Figura 1) possui infraestrutura completa, conta com escritório (Figura 2), laboratório (Figura 3) estoque e sala de campo (Figura 4) e concentra mais de 50% dos seus serviços em pecuária de leite. Executa projetos importantes como o projeto Mais Produtividade do SEBRAE, Projeto Biotech da Danone e projetos de cooperativas, além de produzir todos os meios de PIVE usados nas demais unidades e franquias.



Figura 1. Prédio da unidade de Mogi Mirim – SP.



Figura 2. Escritório.



Figura 3. Laboratório.



Figura 4. Estoque de sêmem/embriões e sala de campo.

O estágio supervisionado foi realizado no período de 02 de janeiro de 2019 a 17 de maio de 2019, com carga horária de 40 horas semanais, totalizando 720 horas.

2.1 SUPERVISÃO DO ESTÁGIO

O supervisor do estágio foi o Médico Veterinário Tomás Augusto Nunes Pinheiro de Souza Reis (CRMV – SP 32499), graduado pela Universidade de São Paulo. Atualmente, ocupa o cargo de Coordenador de Departamento Técnico na empresa ABS/IVB Technologies.

3 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Foram acompanhadas todas as atividades realizadas a campo referentes a PIV e TE de embriões. Entre elas estão seleção e sincronização de receptoras, aspiração folicular (OPU), transferência de embriões (TE), diagnóstico de gestação e sexagem fetal. (Tabela 1)

Tabela 1: Atividades desenvolvidas durante o estágio supervisionado de acordo com o número de animais.

Atividades	Número de animais	%
Aspiração folicular (OPU)	710	33,2
Transferência de embriões (TE)	554	25,9
Diagnóstico de gestação (DG)	438	20,4
Seleção e sincronização de receptoras	250	11,6
Sexagem fetal	185	8,6
Total	2137	100,0

3.1 SELEÇÃO E SINCRONIZAÇÃO DE RECEPTORAS

A seleção das receptoras para utilização em um programa de TETF (Transferência de Embriões em Tempo Fixo) é feita por médicos veterinários através do exame ginecológico do trato reprodutivo e, também, por outros critérios como peso, idade, condição corporal (ECC 1 a 5), ciclicidade, data do último parto, histórico sanitário e reprodutivo. O exame ginecológico é sempre feito via palpação retal, seguido de avaliação ultrassonográfica (DP-2200 vet, Mindray, China).

Preconiza-se o uso de fêmeas mais jovens em bom escore de condição corporal (entre 3 e 4), anatomia do trato reprodutivo que permita a inovulação e que estejam recebendo mineralização adequada. Em novilhas é importante considerar a idade (mínimo 12 meses) e peso (mínimo 300 kg).

Para avaliar a ciclicidade, é fundamental que as fêmeas apresentem corpo lúteo ou folículos pré-ovulatórios, caso contrário são consideradas em anestro ou pré-púberes. Outro ponto importante é que todas as receptoras apresentem útero tônico e com boa espessura.

Para a sincronização das receptoras, usa-se um protocolo hormonal pré-determinado (Figura 5), que tem como objetivo a sincronização da ovulação e a formação de um corpo lúteo funcional, além de um ambiente uterino favorável à implantação do embrião.

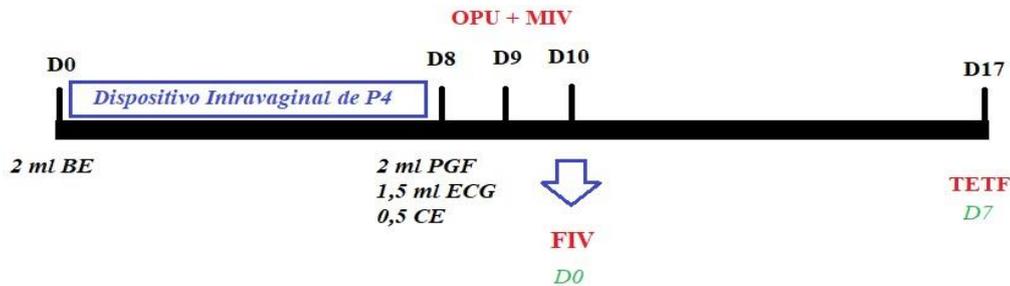


Figura 5. Esquema do protocolo de sincronização, dia da OPU, FIV e TETF.

O protocolo pode sofrer algumas variações dependendo do manejo da fazenda e da agenda de transferências.

3.2 ASPIRAÇÃO FOLICULAR OU OPU (*OVUM PICK UP*)

A técnica de aspiração folicular guiada por Ultrassom já é bem difundida no Brasil e é um método pouco invasivo, causando danos mínimos ao animal, de alta repetibilidade e que apresenta resultados satisfatórios em relação à qualidade dos oócitos obtidos (SENEDA et al., 2003). O procedimento consiste na punção de folículos antrais, que são aspirados através de vácuo para um sistema fechado.

Inicialmente, faz-se a anestesia epidural baixa, com anestésico local à base de lidocaína 2%, a dose varia de 2 a 8 mL, dependendo do peso e da raça da doadora. Posteriormente, os ovários são manipulados via palpação retal e, com o auxílio de uma guia de aspiração acoplada a um transdutor microconvexo, mandril e agulha, os folículos são aspirados via vaginal (Figura 6).

Todo o líquido folicular, juntamente com os oócitos, são depositados em um tubo Falcon com 5 ml de solução (tampão fosfato salino modificado por dulbecco – DMPBs – Nutricell) pré-aquecida a 38°C em banho maria, juntamente com o PBS, pode ou não conter heparina.

O rastreamento e recuperação dos oócitos é feito por um técnico laboratorista em um pequeno laboratório, montado na própria fazenda. O conteúdo aspirado é filtrado e lavado com

solução de PBS, até que se reduza a quantidade de sangue do conteúdo aspirado, melhorando assim a visualização dos oócitos.

Em placa de petri, os oócitos são recuperados e depois lavados em gotas de meio de lavagem. Após esse processo, o selecionador classifica e quantifica os oócitos. Os oócitos são classificados em viáveis (Graus I, II e III) e não viáveis (desnudos e citoplasma irregular) (STRINGFELLOW., et al 2010). Todos os oócitos classificados como viáveis e não viáveis são destinados a maturação.

Após da classificação e contagem, os oócitos vão para os microtubos contendo meio de maturação (MIV), óleo de manutenção e mistura de gases. Os microtubos são acondicionados em uma transportadora de oócitos (MICRO Q, 37-38°C) e enviados ao laboratório em Mogi Mirim – SP para as demais etapas da PIVE.



Figura 6. Equipamento completo de aspiração folicular (OPU).



Figura 7. Laboratório de seleção montado na Fazenda Três Marias em Rondonópolis – MT.

3.3 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (TE)

A empresa trabalha com transferência de embriões à fresco e dois tipos de embriões criopreservados, o vitrificado e o DT (*direct transfer*). A escolha pelo tipo de embrião a ser utilizado, depende da preferência do cliente, manejo da fazenda, receptoras disponíveis, logística, custo, etc.

Quando se utiliza embriões frescos, o envase é feito no próprio laboratório da ABS/IVB em Mogi Mirim – SP e os embriões são transportados em transportadora específica (TE, MICRO Q) até a fazenda onde será realizada a transferência. No caso de embriões vitrificados, o envase pode ser feito tanto no laboratório da ABS/IVB quanto em um laboratório montado na própria fazenda, faz –se o uso dessa segunda opção quando se tem um grande número de embriões a serem transferidos, em dois ou mais dias e em grandes distâncias.

Já o embrião DT possui um manejo bem mais simples, podendo ser descongelado no próprio curral da fazenda de maneira bem semelhante ao sêmen congelado. O descongelamento do embrião DT é feito mantendo-se a paleta 10 segundos no ar seguido de 30 segundos em descongelador (WTA[®]) a 35 °C.

Com as receptoras previamente sincronizadas, faz-se a TETF no D17 do protocolo (Figura 5). Antes da inovulação, cada uma das receptoras é avaliada por palpação retal e exame ultrassonográfico, para verificar a resposta ao protocolo de sincronização. Somente as

receptoras que tiverem um corpo lúteo funcional e tônus uterino correspondente a fase progesterônica do ciclo estral estão aptas a receberem o embrião.

O corpo lúteo das receptoras é sempre classificado em graus 1, 2 ou 3, onde o grau 3 é o mais desejável (maior tamanho, bem delimitado e com ecogenicidade homogênea), com maior capacidade de produção de progesterona.

A TE é feita por um médico veterinário treinado após a realização da anestesia epidural baixa com lidocaína 2%. O embrião é transferido no terço médio do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo.



Figura 8. Material para TETF na Agropecuária GV5, município de Poço Fundo – MG.

3.4 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO E SEXAGEM FETAL

O diagnóstico precoce de gestação pode ser feito 23 dias pós TE, pois o embrião já tem 7 dias no dia da transferência. O diagnóstico de gestação (DG) é feito através de ultrassonografia (Mindray DP2220VET, com transdutor linear). A partir do dia 25 o acúmulo de fluido aumenta consideravelmente, tornando o embrião visível com uso do US. Até o dia 50 de gestação, o embrião cresce a uma média de 1,1mm por dia (KOLOUR et al., 2005). Em muitas das vezes as receptoras diagnosticadas como não gestantes, “vazias”, eram protocoladas para uma nova rodada de TETF.

Fazendo uso do mesmo ultrassom utilizado no DG, procurava-se a localização e posicionamento do tubérculo genital do feto, sendo realizada a partir dos 65 dias de gestação, até aproximadamente 75 dias, sendo considerado o período ideal, devido ao tamanho do feto, para realizar a sexagem. Para uma técnica de sexagem fetal eficiente, deve-se conhecer as várias evoluções anatômicas das estruturas reprodutivas primárias e secundárias de cada sexo durante o seu desenvolvimento embrionário e fetal (CURRAN et al., 1989), visto que, o tubérculo genital feminino se desenvolve a partir da base da cauda, para formar o clitóris e no macho se desenvolve caudal ao cordão umbilical, para formar o pênis.



Figura 9. Lote de receptoras submetidas a diagnóstico de gestação no município de Inocência – MS.

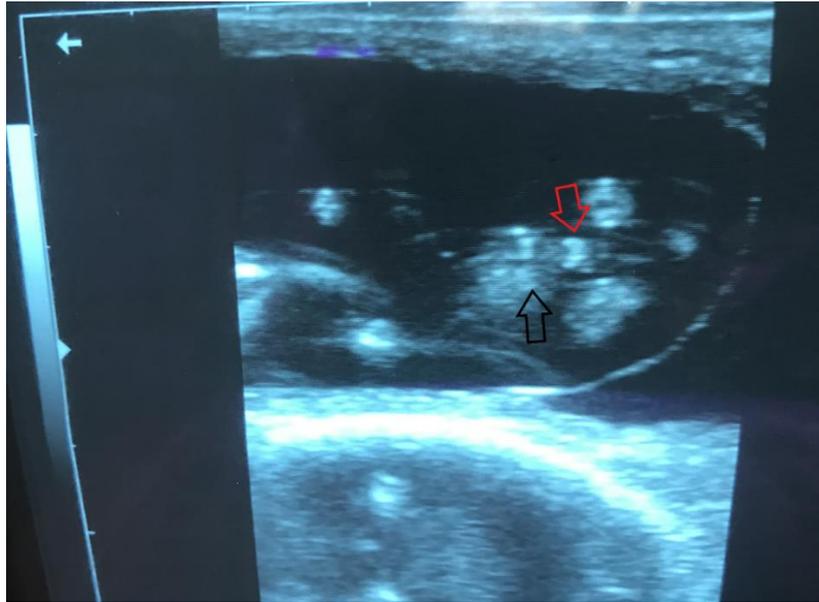


Figura 10. Sexagem fetal de macho. Seta preta: cordão umbilical; seta vermelha: tubérculo genital.



Figura 11. Diagnóstico de gestação com aproximadamente 30 dias.

4 ANÁLISES DO BANCO DE DADOS DO SERVIÇO DE TETF DA EMPRESA ABS/IVB TECHNOLOGIES

4.1. MATERIAL E MÉTODOS

Os dados apresentados abaixo referem-se aos procedimentos relacionados à transferência de embriões (TE) em centrais e fazendas do país, durante o ano de 2018.

As transferências dos embriões foram realizadas pelo método não cirúrgico, no corno uterino ipsilateral ao ovário com corpo lúteo, e todos os procedimentos foram realizados por médicos veterinários capacitados. Foi avaliado o efeito da raça da receptora, efeito do dispositivo de progesterona, efeito do escore de condição corporal (ECC) e o efeito do eCG (gonadotrofina coriônica equina) utilizado sobre a taxa de prenhez aos 30 dias.

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de gestação aos 30 dias foram submetidos a análise de qui-quadrado e regressão logística. O nível de significância definido foi de 5%.

4.3 RESULTADOS

Tabela 2. Relação raça da receptora/taxa de prenhez aos 30 dias.

Raça	Vazia %	Prenhe %	Total
Cruzada	54,9 (450)	45,1 (370)	820
Taurina	62,4 (58)	37,6 (35)	93
Búfalas	69,7 (23)	30,3 (10)	33
Zebuínas	72,4 (178)	27,6 (68)	246
Total			1192

P=0,0001

O efeito da raça da receptora sobre a prenhez foi significativo de acordo com a análise de 1192 transferências. Receptoras cruzadas obtiveram maior taxa de prenhez (45,12%),

quando comparadas a receptoras taurinas (37,63%) e receptoras zebuínas (27,64 %). Em búfalas, a prenhez foi de 30,3 %. (Tabela 2).

Tabela 3. Relação dispositivo de progesterona/taxa de prenhez aos 30 dias.

Dispositivo	Vazia %	Prenhe %	Total
Primer®	52,1 (221)	47,9 (203)	424
Sincrogest®	56,9 (137)	43,2(104)	241
CIDR®	60,7 (145)	39,3 (94)	239
Fertilcare®	82,0 (146)	17,9 (32)	178
Total			1676

P<0,0001

O tipo de dispositivo intravaginal de progesterona (n= 1676), mostrado na Tabela 3, também influenciou a taxa de prenhez (p<0,0001), sendo que a maior taxa foi com o Primer® (47,88%), seguido pelo Sincrogest® (43,15%), depois pelo CIDR® (39,33%) e Fertilcare® (17,98%).

O escore de condição corporal tendeu (p<0,06) a influenciar a prenhez aos 30 dias de forma, que, quanto mais alto o escore, maior a taxa de prenhez.

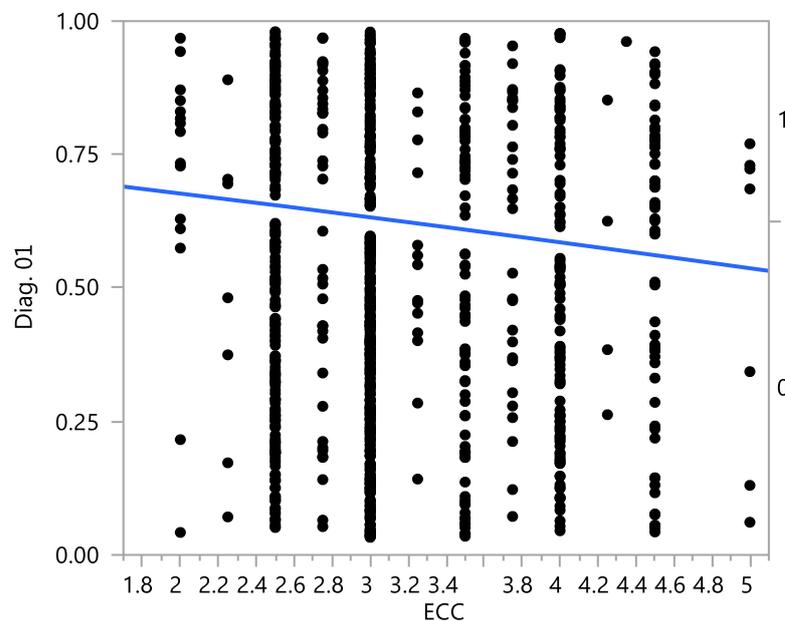


Figura 12: Gráfico da relação ECC e taxa de prenhez aos 30 dias. Quanto maior o escore maior a taxa de prenhez; P<0,06.

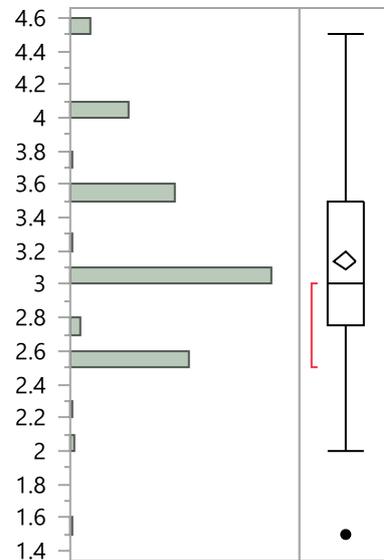


Figura 13: Gráfico da distribuição das prenhez de acordo com o ECC.

Tabela 4: Relação do eCG utilizado com a taxa de prenhez aos 30 dias.

eCG	Vazia %	Prenhe%	Total
Folligon®	42,5 (99)	57,5 (134)	233
Novormon®	55 (132)	45 (108)	240
Sincro eCG®	69,7 (23)	30,3 (10)	33
Total			506

O eCG utilizado, também influenciou na taxa de prenhez aos 30 dias, de acordo com o fabricante do fármaco. O Folligon® obteve melhor resultado (57,5%), seguido do Novormom® (45,0%) e Sincro eCG® (30,3%) (Tabela 4).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de embriões produzidos *in vitro* para programas de TETF é uma realidade e demonstra bons resultados, além de se encaixar em qualquer sistema pecuário.

A empresa ABS/IVB Technologies se mostra como uma forte empresa no mercado de embriões e desempenha um papel muito importante no desenvolvimento da técnica.

O estágio supervisionado foi de grande importância no aprendizado sobre as atuais biotecnologias e aperfeiçoamento das relações humanas e profissionais.

REFERÊNCIAS

CURRAN, S.; KASTELIC, J.P.; GINTHER, O.J. Determining sex of the bovine fetus by ultrasonic assessment of the relative location of the genital tubercle. **Animal Reproduction Science**, v. 19, p. 217-227. June. 1989.

GONÇALVES, Paulo Bayard Dias; FIGUEIREDO, José Ricardo De; FREITAS, Vicente José De Figueirêdo. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2 ed. Rio de Janeiro: ROCA, 2008. 395 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (Brasil). Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária. 2017. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201701caderno.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2017.

KOLOUR, A.K.; BATAVANI, R.A.; ARDABILI, F.F. Preliminary observations on the effect of parity on first day ultrasonic detection of embryo and its organs in bovine”, **Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, n. 2, p. 74-77. Mar. 2005

SENEDA, M, M. et al. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound- guided transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, New York, v. 59, n. 5- 6, p. 1435-1440 Mar. 2003.

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. **Manual of the International Embryo Transfer Society**. Illinois: International Embryo Transfer Society, 2010. 200p