



NATÁLIA DE AGUIAR BANDÓRIA

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES OVINOS NA
CABANHA LUXOR E EMBRYOPLUS BRASIL**

**LAVRAS-MG
2021**

NATÁLIA DE AGUIAR BANDÓRIA

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES OVINOS NA CABANHA LUXOR E
EMBRYOPLUS BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Colegiado do Curso de
Zootecnia, como parte das exigências para
a obtenção do título de Bacharel em
Zootecnia.

Prof (a). Dr (a). Iraides Ferreira Furusho Garcia
(Orientadora)

LAVRAS – MG

2021

NATÁLIA DE AGUIAR BANDÓRIA

**PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES OVINOS NA CABANHA LUXOR E
EMBRYOPLUS BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Colegiado do Curso de
Zootecnia, como parte das exigências para
a obtenção do título de Bacharel em
Zootecnia.

APROVADO em 10 de março de 2021

Prof. Dra. (PhD) Iraides Ferreira Furusho Garcia UFLA

Prof. Dr. (PhD) José Camisão de Souza UFLA

Dr. Izac Leopoldino Júnior

Prof (a). Dr (a). Iraides Ferreira Furusho Garcia
(Orientadora)

LAVRAS – MG

2021

Aos meus pais, Rose e Maurício, e meu irmão Caio, que são meu alicerce, meus exemplos de amor, educação, honestidade e integridade.

À minha avó Teresinha (in memoriam), uma das pessoas mais importantes da minha vida e que mais contribuíram com a pessoa que sou hoje. Em retribuição a todo apoio incondicional, companheirismo, todo amor, carinho e toda proteção e cuidados, mesmo que em outro plano.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, da sabedoria e das bênçãos realizadas em minha vida.

Agradeço aos meus pais, Rose e Maurício, por todo o apoio e amor incondicionais desde sempre, por me criarem com muita integridade, honestidade e carinho, demonstrando desde cedo a importância da educação e me incentivando nos estudos desde o fundamental. Sem o apoio deles, com certeza não teria conseguido chegar até aqui.

Agradeço ao meu irmão Caio, que apesar de todos os desentendimentos, sempre foi muito companheiro, protetor e me apoiou nos momentos mais importantes da minha vida.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras por todas as oportunidades, todo suporte e todo ensino ao longo da graduação. E a todos os profissionais envolvidos na minha formação, direta ou indiretamente. A todos os professores, técnicos, colaboradores e funcionários, a excelência do ensino e da universidade se deve a eles.

Agradeço a professora Iraides Ferreira Furusho Garcia por me acolher, me ensinar e orientar com tanta dedicação e paciência durante a realização deste trabalho.

Agradeço ao GAO (Grupo de Apoio à Ovinocaprinocultura) pelo acolhimento quando ainda me sentia perdida dentro da zootecnia, pelos ensinamentos, o companheirismo, as amizades que fiz e a oportunidade de me encontrar e crescer, tanto pessoal quanto profissionalmente.

Agradeço aos meus amigos de graduação por todo apoio incondicional, ajuda nos estudos e nos perrengues, pelas festas e o companheirismo em todos os momentos, foram essenciais para minha permanência em Lavras e minha formação.

Agradeço às empresas Embryoplus Brasil e Cabanha Luxor, especialmente à Carol, pela oportunidade do estágio, e também à Josi, Eduardo, Matheus e todos os funcionários por todas as experiências vivenciadas, pela amizade criada, pelo acolhimento e todo o ensinamento passado, essenciais para condução deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

A ovinocultura é uma atividade zootécnica que vem ganhando destaque no Brasil e ao redor do mundo, com crescimento notável no seu rebanho efetivo. Para acompanhar e manter este crescimento, fazem-se cada vez mais necessárias melhorias no seu manejo reprodutivo, sendo a produção *in vitro* de embriões (PIV) uma ferramenta biotecnológica bastante interessante. O objetivo deste trabalho de conclusão de curso foi descrever as atividades realizadas no estágio obrigatório supervisionado, realizado na Central de Reprodução Embryoplus Brasil e na Cabanha Luxor, no período de 06/10/2020 a 03/12/2020. As empresas fazem parte de uma mesma propriedade, localizada na cidade de Monte Mor (SP), tendo como proprietário o Sr. Edison Nalin Caretta. A Cabanha Luxor possui um rebanho ovino das raças Dorper e White Dorper, com foco em produção e venda de genética. A Central de Reprodução Embryoplus Brasil, além de atuar dentro da própria propriedade, oferece e realiza serviços para todo Brasil. A principal atividade acompanhada durante o estágio foi a produção *in vitro* de embriões ovinos (e bovinos), desde a coleta dos oócitos até a inovulação dos embriões produzidos, sendo todas as etapas acompanhadas e aqui descritas, relatando os entraves de cada uma delas. Além da PIV, foram acompanhadas as atividades diárias da cabanha e consultorias realizadas pelos médicos veterinários responsáveis. Portanto, as atividades desenvolvidas durante o estágio foram de grande importância para complementar a prática de toda a teoria passada e aprendida durante a graduação. Ambas empresas prezam pelo trabalho de qualidade e excelência, tendo o estágio contribuído de forma muito positiva tanto na área profissional quanto na pessoal.

Palavras chave: Genética. Reprodução. Dorper. Oócitos. Ovinocultura. PIV. FIV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem aérea da propriedade	12
Figura 2 – Laboratório Embryoplus Brasil	13
Figura 3 – Cronograma da PIV de ovinos	14
Figura 4 – Aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal em cabras..	16
Figura 5 – Exteriorização do trato reprodutivo de ovelha Dorper	17
Figura 6 – Ovelha contida em maca em ângulo de 45° para coleta de oócitos via LOPU	19
Figura 7 – Maleta de anestesia inalatória utilizada para coleta de oócitos via LOPU	20
Figura 8 – Locais de inserção para coleta de oócitos via LOPU	21
Figura 9 – Exame dos folículos em ovário superestimulado para LOPU	22
Figura 10 – Etapas do rastreamento dos oócitos	23
Figura 11 – Etapas do rastreamento de oócitos.....	24
Figura 12 – Laboratório de rastreamento montado a campo	25
Figura 13 – Oócitos aspirados.....	26
Figura 14 – Transportadora de oócitos e embriões contendo criotubos com oócitos em MIV.....	27
Figura 15 – Seleção espermática a partir do método gradiente descontínuo de Percoll®.....	30
Figura 16 – Embriões em fase de FIV e CIV em incubadora	32
Figura 17 – Incisões para inovulação de embriões	34
Figura 18 - Inovulação do embrião em corno exposto.	35
Figura 19 – Embriões envasados na máquina de congelamento.....	36
Figura 20 – Imagem de ultrassom com placentônios	38
Figura 21 – Imagem de ultrassom com diferenciação de cabeça e tronco	38
Figura 22 – Realização do diagnóstico de gestação	39
Figura 23 – Lote para diagnóstico de gestação.....	39
Figura 24 – Matriz e cordeiro da raça Dorper.....	40
Figura 25 – Matrizes da raça White Dorper.....	41
Figura 26 – Baia de fêmeas paridas com solário de terra batida	43
Figura 27 – Baias com colcho pré-moldado de concreto	44
Figura 28 – <i>Creep-feeding</i>	45
Figura 29 – Mesa para tosquia de ovinos	46
Figura 30 - Mesa cirúrgica veterinária	47

Figura 31 - Fêmea contida em maca de contenção	48
Figura 32 – Matrizes White Dorper aguardando a LOPU contidos com grade móvel	49
Figura 33 – Reprodutor e matrizes Dorper em baia de monta natural controlada.....	53
Figura 34 - Tosquia	56
Figura 35 – Tosquiadeira elétrica	56
Figura 36 – Casqueamento	57

LSTA DE TABELAS

Tabela 1 – Protocolo para aspiração de oócitos via LOPU	18
Tabela 2 – Classificação oocitária de acordo com as células do <i>cumulus oophorus</i> e aspecto do ooplasma (citoplasma do oócito).	26
Tabela 3 - Exigências de PB para ovinos em manutenção, gestação e lactação, segundo NRC 2006.....	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 AS EMPRESAS	12
3 EMBRYOPLUS BRASIL	12
3.1 Produção <i>In Vitro</i> De Embriões (PIV)	13
3.1.1 Coleta.....	15
3.1.2 Rastreamento De Oócitos	23
3.1.3 Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	28
3.1.4 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	29
3.1.5 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	31
3.1.6 Inovulação Dos Embriões	33
3.2 Diagnóstico de gestação	36
4 CABANHA LUXOR	40
4.1 Instalações	41
4.1.1 Baias	42
4.1.1.1 Solário	42
4.1.1.2 Bebedouros e Comedouros.....	43
4.1.1.3 <i>Creep-feeding</i>	44
4.1.2 Quarentena	45
4.1.3 Galpão de procedimentos reprodutivos e tosquia	46
4.2 Manejo alimentar e alimentação	49
4.3 Manejo Reprodutivo	52
4.4 Manejo Dos Cordeiros	54
4.5 Manejos Rotineiros	55
5. CONCLUSÃO	58
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura é, provavelmente, a atividade zootécnica mais antiga existente, já que as espécies caprinas e ovinas foram as primeiras a serem domesticadas segundo relatos, à cerca dez mil anos atrás.

Atualmente, a ovinocultura é uma área da produção animal que vem ganhando espaço no Brasil, o que pode ser facilmente comprovado ao analisar os dados de produção. Segundo a FAO (2021), o rebanho efetivo brasileiro de ovinos em 2019 foi de cerca de 20 milhões de cabeças, enquanto no ano de 1999 esse rebanho não passava de 14,5 milhões, atestando um aumento considerável ao longo destes 20 anos. Ainda no ano de 2019, o Brasil foi responsável por produzir cerca de 97 mil toneladas de carne ovina, 26 mil toneladas a mais que em 1999, com ascensão da produção registrada em outros países também. São vários os aspectos responsáveis para o crescimento (tanto em qualidade, quanto quantidade) da atividade, como melhora nos sistemas de produção, manejos sanitários corretos, nutrição adequada, aumento no consumo e aceitação da carne ovina, maior valorização no mercado e o melhoramento genético acompanhado de biotecnologias reprodutivas.

O uso de biotecnologias se faz necessário na reprodução de ovinos para contornar algumas limitações na espécie (como estacionalidade reprodutiva, e a dificuldade gerada (barreira) pelos anéis cervicais na fêmea ovina) e para acelerar o melhoramento genético. A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma ferramenta muito interessante e possibilita a obtenção de progênie de alto valor genético, de maneira menos invasiva que a transferência de embriões produzidos *in vivo* (MOTE). A eficiência dessa biotecnologia ainda é menor quando comparada a MOTE, porém, se trata de um procedimento menos invasivo, a coleta de oócitos para PIV pode ser feita muitas vezes, e em um espaço de tempo menor, o que acaba trazendo vantagens nos resultados finais.

Este trabalho de conclusão de curso tem por objetivo relatar todas as atividades realizadas durante o estágio supervisionado obrigatório realizado nas empresas Embryoplus Brasil e Cabanha Luxor, focando principalmente na produção *in vitro* de embriões e o uso desta biotecnologia para incrementar a produção de ovinos geneticamente melhorados.

2 AS EMPRESAS

O estágio obrigatório supervisionado foi realizado nas empresas Embryoplus Brasil e Cabanha Luxor, ambas localizadas na propriedade do Sr. Edison Nalin Caretta, no período de 06/10/2020 a 03/12/2020, sob a supervisão do médico veterinário Matheus de Oliveira Souza Castro.

A propriedade se localiza no município de Monte Mor, interior de São Paulo, a uma latitude 22°56'48" sul, e longitude 47°18'57" oeste, estando a uma altitude de 560 metros (Figura 1).

Figura 1 – Imagem aérea da propriedade



Fonte: Google Earth

3 EMBRYOPLUS BRASIL

A empresa Embryoplus Brasil é uma Central de Reprodução animal, onde são prestadas consultorias reprodutivas e realizados diversos procedimentos no Brasil todo. A Central Embryoplus, antiga Novagen Genética, é registrada junto ao MAPA e autorizada à produção de sêmen, embriões *in vivo* e *in vitro*, e diagnóstico de gestação e sexagem em rebanhos bubalinos, caprinos, ovinos e bovinos, sendo as duas últimas espécies as mais trabalhadas durante o período de estágio.

Dentre as atividades citadas acima, as realizadas e acompanhadas durante o estágio foram: a produção de embriões *in vitro* (PIV) e diagnóstico de gestação. Essas atividades serão discorridas e apresentadas no presente trabalho.

Para atender às demandas de PIV e diagnóstico de gestação, a empresa conta com infraestrutura adequada, incluindo laboratório completo (Figura 2) e equipamentos de tecnologias avançadas.

Figura 2 – Laboratório Embryoplus Brasil



Fonte: Instagram Embryoplus Brasil

Atualmente, a empresa está sendo gerida pelos médicos veterinários Carolina Caretta e Eduardo Ramos de Oliveira. A equipe conta ainda com a veterinária e laboratorista Josiane Rossi e o médico veterinário Matheus Castro, sendo esse último o supervisor durante o período de estágio.

3.1 Produção *In Vitro* De Embriões (PIV)

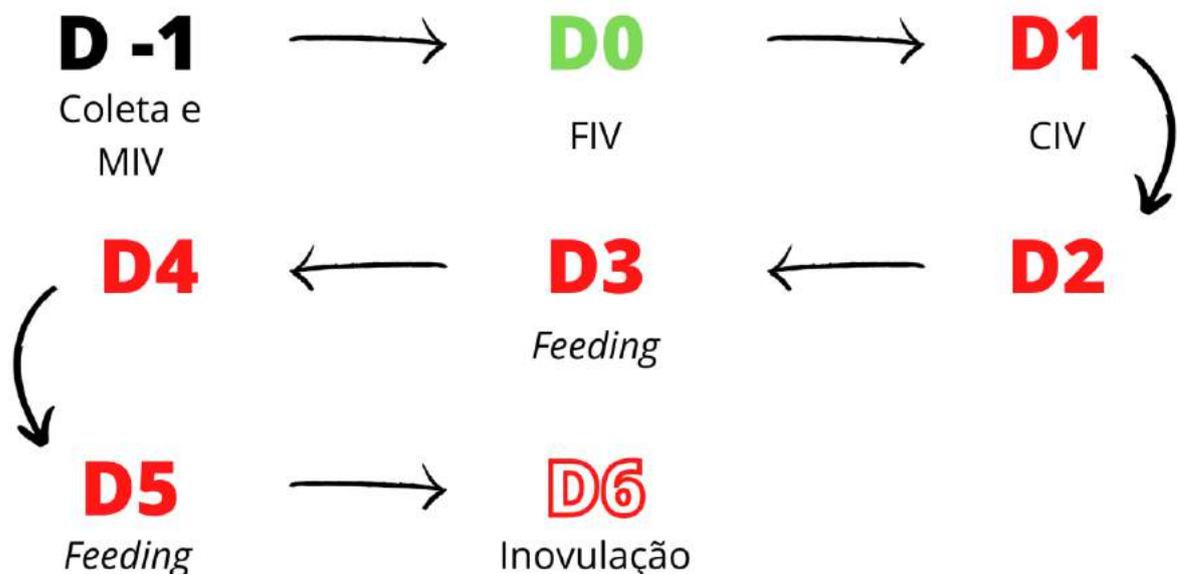
A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotecnologia reprodutiva que permite a formação de um novo indivíduo através da interação entre espermatozóide e oócito fora do trato reprodutivo da fêmea. A PIV envolve as etapas de coleta dos

oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e embriões fora do útero animal (GONÇALVES; FIGUEREDO; FREITAS, 2008). A eficiência dessa biotecnologia está associada, especialmente, à qualidade do oócito, sendo proporcional à presença dos complexos *cumulus-oophorus* (COCs), que são o conjunto de células foliculares que mantêm o oócito preso à parede do folículo. Além disso, o sucesso da PIV está associado também às características dos procedimentos de recuperação dos COCs (RODRIGUEZ et al., 2006).

A PIV se apresenta como uma biotecnologia interessante e de custo relativamente baixo para obtenção de embriões destinados à pesquisa, estudo da fisiologia do desenvolvimento embrionário, aplicação em programas de melhoramento genético e suporte a biotecnologias emergentes (BALDASSARE, et al., 2002).

Na prática, o período de duração da PIV é de 8 dias, sendo cada uma das etapas feitas em determinado dia (D), assim como mostra o cronograma da PIV de ovinos (Figura 3).

Figura 3 – Cronograma da PIV de ovinos



Dn: Dia n da produção *in vitro* de embriões; **Feeding:** troca de 50% do meio de cultivo.

Fonte: Da autora (2021)

3.1.1 Coleta

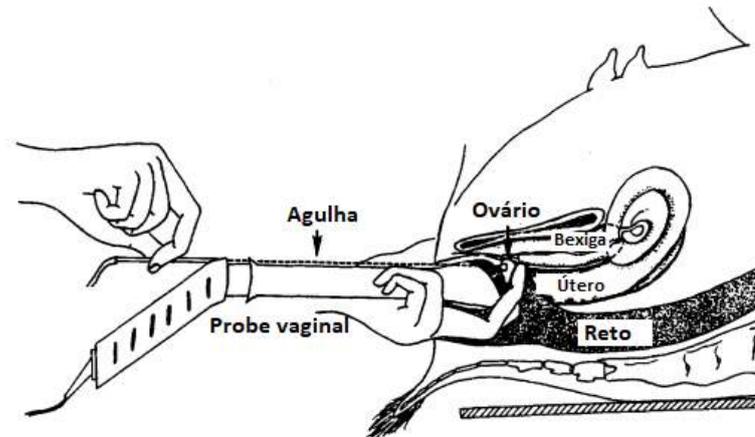
Os oócitos, usados na PIV de embriões ovinos, podem ser obtidos de fêmeas adultas ou pré-púberes, sendo elas previamente submetidas ou não a um tratamento hormonal. Esse tratamento hormonal é indicado principalmente para fêmeas pré-púberes, em anestro estacional ou fêmeas geneticamente superiores, visando estimular o crescimento folicular e obtenção de um maior número de oócitos por ovário na coleta (BERNARDI, 2005). Estes oócitos podem ser recuperados através de técnicas *in vivo* ou *post-mortem*, neste segundo caso, de ovários vindos de abatedouros.

Em ovários obtidos *post mortem*, os COCs podem ser recuperados através da técnica *slicing*, que consiste no fatiamento do ovário, ou por aspiração, através de agulha acoplada à seringa ou bomba à vácuo (BERNARDI, 2005). A técnica de *slicing* possibilita uma recuperação mais eficiente em número de oócitos, pois consegue acessar folículos localizados mais profundamente no interior do ovário. Entretanto, é uma técnica mais demorada, e que resulta numa maior quantidade de debris (vestígios de células ou tecidos mortos e danificados), dificultando a identificação dos COCs, sendo considerada então, a aspiração folicular uma técnica mais simples, rápida e que permite a obtenção de COCs de melhor qualidade (WANI, 2002; WANI et al., 2000), *no post mortem*.

Já na coleta *in vivo*, os métodos utilizados são aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal (TUGA), aspiração folicular por laparotomia, e aspiração folicular por laparoscopia – Laparoscopic ovum pick-up (LOPU).

A TUGA (Figura 4), é o método de aspiração mais conhecido e usado em coleta de várias espécies, por ser menos invasiva que os outros métodos. Porém, quando se trata de pequenos ruminantes, este método ainda é muito limitado devido algumas restrições anatômicas, principalmente em fêmeas de menor porte, tornando a técnica mais complexa, por conta da dificuldade em manipular o ovário através da vagina (BALDASSARRE et al., 1994; BALDASSARRE et al., 1996; GRAFF et al., 1999).

Figura 4 – Aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal em cabras



Fonte: Adaptado de Graff et al. (1999)

A aspiração folicular por laparotomia é uma técnica onde há a exteriorização do trato reprodutivo da fêmea (Figura 5) para que a coleta seja realizada, o que pode causar formação de aderências pós-operatórias no útero, ovário ou nas tubas do animal caso não seja realizada com o devido cuidado (ISHWAR, MEMON, 1996), ou realizada sucessivamente por longos períodos. Este método consiste em anestésiar o animal e realizar uma incisão na linha alba, para posterior exteriorização dos cornos uterinos, o que acaba causando estresse ao animal devido à anestesia e à cirurgia, além de limitar o uso da doadora e ser um método de custo relativamente alto (PAULA et al., 2008).

Figura 5 – Exteriorização do trato reprodutivo de ovelha Dorper



Fonte: Instagram Cabanha Luxor

Por fim, temos a aspiração folicular por laparoscopia (LOPU), a técnica usada para as coletas de óocitos realizadas durante o estágio que, por este motivo, será tratada separadamente.

3.1.1.1 Aspiração Folicular por Laparoscopia (LOPU)

Esta é uma técnica na qual a aspiração folicular é feita com o uso de uma agulha acoplada em uma bomba à vácuo, e guiada por um laparoscópio (BALDASSARRE, 2008). Tem como vantagem ser menos invasiva e provocar mínimo trauma cirúrgico, podendo ser realizada diversas vezes em um curto intervalo de tempo, o que acaba compensando a produção relativamente mais baixa à cada aspiração (em média, 4 óocitos/fêmea, sem tratamento hormonal, e de 10 a 11 óocitos/fêmea quando submetidas a tratamento de estimulação com FSH e/ou LH (CORDEIRO et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2011; CHAVES et al., 2010). No estágio, as fêmeas doadoras eram submetidas a protocolo hormonal de superovulação com FSH (hormônio folículo estimulante) (Tabela 1).

Tabela 1 – Protocolo para aspiração de oócitos via LOPU

Dia	Data	Hora	Hormônio/medicamento	Quantidade
D0	23/11/2020	7h00	CIDR	1
		7h00	Potenay	5 mL
		7h00	Cydectin	2 mL
D14	07/12/2020	19h00	Folltropin	2 mL
D15	08/12/2020	7h00	Folltropin	1,5 mL
		12h00	Remover comida	
		14h00	Remover água	
		19h00	Folltropin	1,5 mL
D16	09/12/2020	8h00	LOPU	
		8h00	Remover CIDR	

Fonte: Da autora (2021)

Neste protocolo, no D0, as ovelhas recebem o CIDR (dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona), uma dose de Potenay® (suplemento vitamínico com B12 e B6) e uma dose de Cydectin® (endectocida). As doadoras recebem 3 doses de FSH (Folltropin ®) com intervalo de 12 horas entre si, sendo uma em D14 e outras duas em D15. No dia da coleta dos oócitos, D16, a aspiração é feita e o CIDR é retirado.

Para diminuir o conteúdo ruminal, evitar problemas de timpanismo e refluxo gástrico, e ainda melhorar a visualização dentro da cavidade abdominal, se faz necessário realizar a LOPU após um período de 36 a 48 horas de jejum sólidos e de 24 horas de líquidos (CORDEIRO et al., 2014).

Todo o procedimento deve ser realizado com o animal sob anestesia inalatória (Figura 7). Com anestesia local realizada, a fêmea é colocada em maca de contenção, e em posicionamento de 45° para facilitar a visualização do sistema geniturinário, através do deslocamento dos órgãos propiciada por essa posição (Figura 6). Porém, é preciso ter muita atenção à frequência cardiorrespiratória do animal, pois este posicionamento causa uma pressão dos órgãos abdominais sobre o diafragma, podendo levar à depressão respiratória (WIECZOREK et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2013). Durante o estágio, essa depressão respiratória ocorreu com um dos animais durante a coleta. Neste caso específico, percebeu-se que a frequência cardiorrespiratória diminuiu consideravelmente, e

imediatamente foi colocado em posição horizontal para aliviar a pressão sobre o diafragma, contornando a situação.

Figura 6 – Ovelha contida em maca em ângulo de 45° para coleta de oócitos via LOPU



Fonte: Da autora (2021)

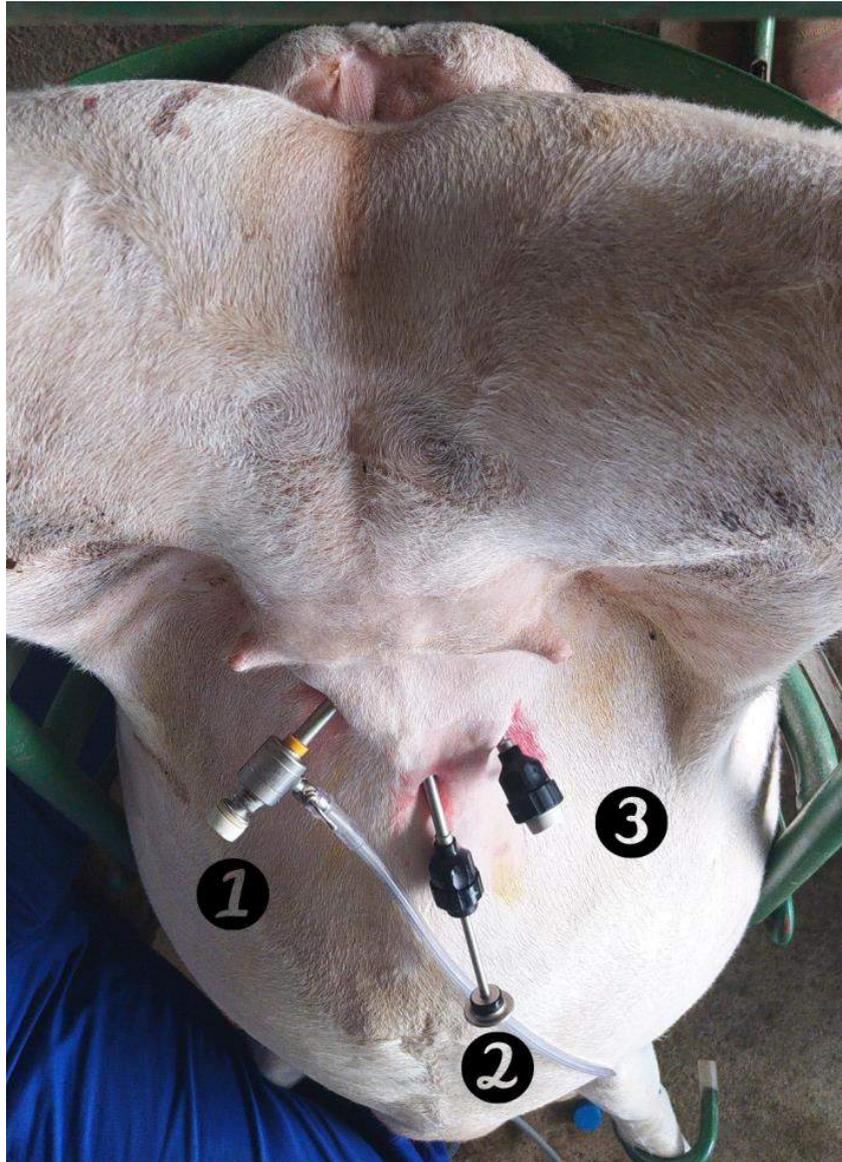
Figura 7 – Maleta de anestesia inalatória utilizada para coleta de oócitos via LOPU



Fonte: Da autora (2021)

Com a analgesia local feita, manutenção anestésica obtida, e o animal já posicionado e contido na maca, a incisão cutânea é feita com uso de um bisturi. Após a incisão, os trocâteres são inseridos, usando três acessos triangulados adequadamente para o procedimento (Figura 8). O pneumoperitônio é obtido com velocidade de insuflação de 5L/min de CO₂ e pressão intrabdominal (PIA) de 5 mmHg, afim de permitir ao operador a manipulação do útero, das tubas e dos ovários com ajuda da pinça atraumática (TEIXEIRA et al., 2011).

Figura 8 – Locais de inserção para coleta de oócitos via LOPU



1. Ótica do laparoscópio; 2. Agulha de aspiração; 3. Pinça atraumática.

Fonte: Da autora (2021)

Antes da aspiração em si, é necessário examinar os ovários (Figura 9), e contabilizar os folículos entre 2 e 8 mm, sendo os folículos aspirados somente os que estiverem dentro desse intervalo. Folículos menores que a faixa citada são inviáveis de se aspirar, e os maiores apresentarem menor qualidade. Logo após, a agulha de aspiração é introduzida na cavidade próxima ao ovário, e a punção é realizada com a ajuda da movimentação do ovário em diversas posições, com o auxílio da pinça atraumática. A agulha é posicionada paralelamente a superfície ovariana, permitindo a perfuração dos folículos em suas extremidades, e uma vez

inserida, a agulha é movida cuidadosamente afim de garantir que todo conteúdo folicular seja aspirado (TEIXEIRA et al., 2011).

Figura 9 – Exame dos folículos em ovário superestimulado para LOPU



Fonte: Instagram Embryoplus Brasil

3.1.2 Rastreamento De Oócitos

O rastreamento consiste em lavar, filtrar o conteúdo aspirado, identificar os oócitos, contá-los, classificá-los e armazená-los (Figuras 10 e 11).

Figura 10 – Etapas do rastreamento dos oócitos



Fonte: Da autora 2021)

O rastreamento dos oócitos aspirados é feito imediatamente após a aspiração, num laboratório montado próximo do curral (Figura 12). É de extrema importância que não haja muita radiação incidente dentro deste local, e que haja energia elétrica para os equipamentos necessários, como a lupa, a placa aquecedora, a transportadora de oócitos e o banho-maria.

Figura 11 – Etapas do rastreamento de oócitos



A. Conteúdo folicular aspirado.



B. Filtragem do conteúdo folicular aspirado.



C. Conteúdo folicular filtrado na placa de petri riscada.



D. Localização dos oócitos aspirados.



E. Contagem de oócitos aspirados.



F. Oócitos aspirados em meio de lavagem.



G. Transferência dos oócitos lavados para criotubos.



H. Injeção de gás para maturação dos oócitos.



I. Criotubos colocados na transportadora de oócitos.

Fonte: Da autora (2021)

Figura 12 – Laboratório de rastreamento montado a campo



Fonte: Da autora (2021)

O conteúdo aspirado é levado até o laboratório em um tubo falcon, sendo necessário protegê-lo da radiação solar durante o trajeto para que não haja nenhum dano aos oócitos. Chegando no laboratório, o tubo é colocado em banho-maria, à 37°C, e em seguida, o conteúdo aspirado é lavado com DMPBS (Tampão Fosfato Salino Modificado por Dulbecco) e filtrado, retirando possíveis coágulos e células que não sejam os oócitos.

Após lavado, o conteúdo é colocado em uma primeira placa de petri, e é nesse momento que começa o rastreamento (Figura 13). Essa primeira placa utilizada é riscada afim de facilitar no processo de rastreamento e na contagem dos oócitos. A contagem é feita com o auxílio da lupa, e após identificados, os oócitos são classificados de acordo com sua viabilidade e seu grau (Tabela 1).

Segundo Gonçalves et al. (2008 citado por SOUZA, 2015, p.27), os oócitos recuperados são classificados de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 – Classificação oocitária de acordo com as células do *cumulus oophorus* e aspecto do ooplasma (citoplasma do oócito).

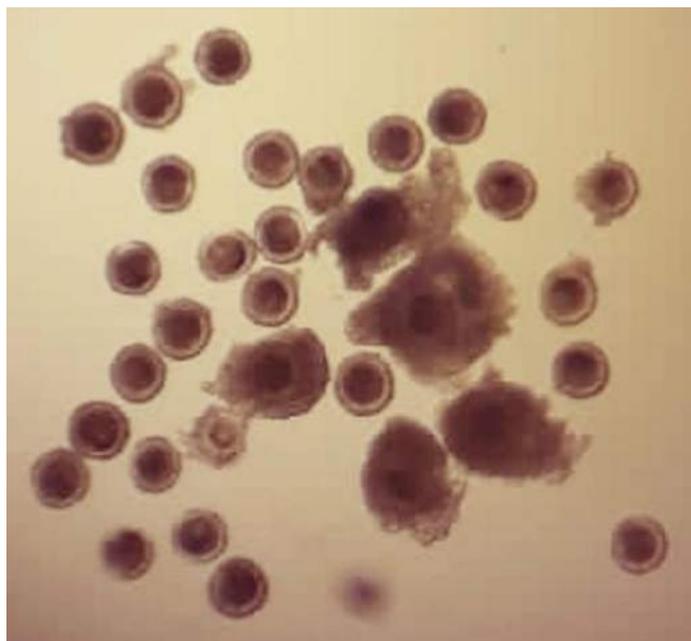
GRAU	CARACTERÍSTICAS
I	Envolto por mais de três camadas de células do <i>cumulus</i> e ooplasma homogêneo.
II	Envolto por uma a três camadas parcialmente compactadas de células do <i>cumulus</i> e ooplasma ainda homogêneo.
III	Células do <i>cumulus</i> expandidas e ooplasma heterogêneo, contraído e preenchendo de forma irregular a zona pelúcida.
IV	Células do <i>cumulus</i> inexistentes, oócito se apresenta desnudo.

(Fonte: Adaptado de GONÇALVES ET al., 2008)

Assim que os oócitos são coletados e classificados, os que apresentam entre três e quatro camadas de células do cumulus (no mínimo), citoplasma granulado homogeneamente e coloração homogênea, são considerados aptos para a PIV e seguem para a MIV, ou seja, todos os classificados como grau I e grau II (COCERO et al., 2011).

Após classificação, são transferidos para uma outra placa contendo meio comercial próprio para lavagem. Depois dessa última lavagem, os oócitos são transferidos para um tubo contendo meio comercial para maturação.

Figura 13 – Oócitos aspirados



Fonte: Instagram Embryoplus Brasil

Caso os oócitos não possam ser colocados imediatamente em incubadora para iniciar a fase de maturação, assim que colocados no criotubo, juntamente ao meio, é injetado CO₂ que auxiliará na maturação dos oócitos. Após injetar o gás, os tubos são colocados na transportadora de oócitos e embriões (Figura 14), que manterá estes oócitos em temperatura de 37°C, e levados para a Central de Reprodução onde será realizada a FIV.

Figura 14 – Transportadora de oócitos e embriões contendo criotubos com oócitos em MIV



Fonte: Da autora (2021)

3.1.3 Maturação *in vitro* (MIV)

O processo de maturação *in vitro* (MIV) envolve o cultivo dos oócitos imaturos coletados para que atinjam o estágio de metáfase II da meiose e completem a maturação citoplasmática, momento em que estarão prontos para serem fecundados (COGNIÉ et al., 2004). Essa maturação envolve diversas transformações, como modificações citoplasmáticas, nucleares e moleculares, todas elas relacionadas a uma série de mudanças bioquímicas e estruturais que tornam o oócito apto a ser fecundado e se desenvolver posteriormente (GONÇALVES et al., 2008). Esta é uma das etapas mais importantes da PIV, e, segundo Fonseca et al. (2010), um dos grandes desafios para o sucesso da MIV é a enorme heterogeneidade quando se trata da qualidade dos oócitos recuperados, tendo como resultado final uma maior variabilidade na produção de embriões. Essa grande heterogeneidade ocorre pois, apesar da classificação morfológica feita durante o rastreamento dos oócitos coletados, esses parâmetros podem ser insuficientes para prever a competência do oócito em se desenvolver após a fecundação.

Para que a maturação ocorra, é essencial levar em consideração o meio de maturação utilizado e as condições físicas do meio. Em relação às condições físicas, segundo Amiridis e Cseh (2012), a MIV é realizada em estufa com temperatura de 38 a 39°C, em atmosfera de 5% de CO₂ por 22-24 horas. Já o meio de maturação mais utilizado, de acordo com Cocero (2011), é o TCM199 (“TissueCultureMedium” - 199), suplementado com estradiol, FSH, LH, piruvato, bicarbonato e soro fetal bovino (SFB). O estradiol está presente no meio de maturação porque possui efeito positivo nas taxas de clivagem e formação de blastocistos (GULER et al., 2000).

O SFB e o BSA (Albumina Sérica Bovina) são usados como fonte protéica na MIV de várias espécies. O SFB tem seu efeito benéfico durante a maturação devido às substâncias presentes neste soro, como hormônios, proteínas, lipídeos, fatores de crescimento e vitaminas que ajudam na maturação nuclear e citoplasmática, porém, existe uma grande variabilidade dessas substâncias entre lotes de SFB, algumas substâncias desconhecidas e até contaminantes, tornando-o um meio de cultivo indefinido, ocasionando uma limitação no seu uso (ACCARDO et al., 2004; SHIRAZI et al., 2012). O BSA é uma macromolécula que, por sua vez, apresenta uma variabilidade menor na sua composição, podendo ser considerado como meio semi-definido, e que é comumente usado como meio proteico para MIV de ovinos

(ACCARDO et al., 2004). Especificamente, durante o período de realização deste estágio, nos meios de maturação, adicionava-se apenas o SFB, sendo o BSA adicionado nos meios de cultivo e de FIV.

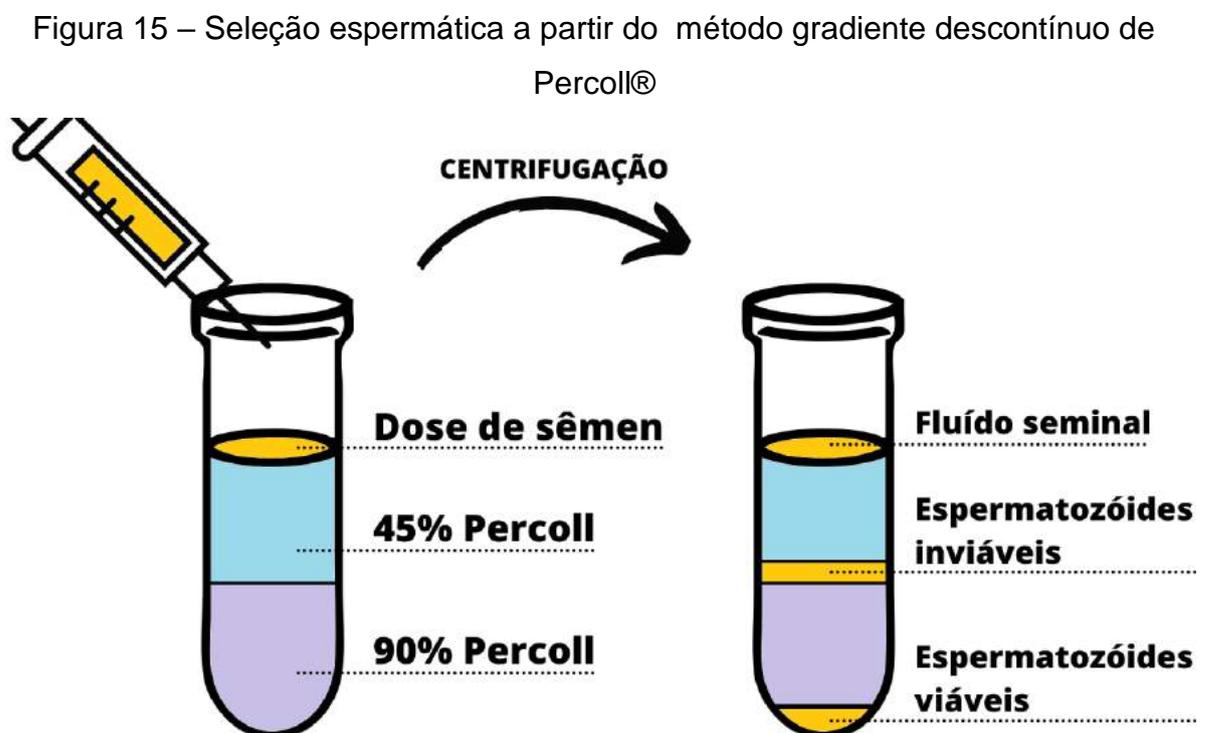
3.1.4 Fecundação *in vitro* (FIV)

A FIV é uma etapa muito importante durante a produção de embriões, ela se refere ao processo no qual o espermatozóide e o oócito entram em contato, gerando o zigoto e se desenvolvendo até o estágio de blastocisto posteriormente, na próxima etapa da PIV. Além da fecundação propriamente dita, o uso, a escolha e a capacitação espermática do sêmen são pontos que merecem atenção.

Durante a PIV, o sêmen utilizado para a fecundação pode ser o fresco ou o congelado, sendo a escolha a critério do criador. O uso de sêmen congelado é o que mais tem sido escolhido devido a sua praticidade de aquisição e manipulação, pois nem sempre é possível coletar sêmen na hora da FIV. Ou então, quando não há um reprodutor de boa qualidade disponível, com um ejaculado de boa concentração, sêmen com boa motilidade espermática e sem patologias, situações que podem comprometer o resultado final da PIV. Porém, por se tratar de um processo de criopreservação, no momento do congelamento ou descongelamento, é sabido que podem ocorrer danos espermáticos severos, afetando motilidade, tempo de viabilidade e até mesmo sua capacidade fertilizante. Antigamente, o uso do sêmen ovino congelado não era recomendado para inseminação artificial e outros procedimentos reprodutivos devido à baixa fertilidade após o descongelamento, mas a pesquisa e a busca por diluidores e crioprotetores adequados à espécie permitem que hoje a escolha e o uso do sêmen congelado seja uma boa opção com bons resultados. Segundo Romão et al. (2013), mesmo não havendo diferença entre as taxas de desenvolvimento embrionário quando comparado o uso de sêmen fresco ou congelado, os blastocistos obtidos daqueles fecundados com sêmen fresco foram de melhor qualidade morfológica.

Independentemente do tipo de sêmen usado, fresco ou congelado, antes da fecundação, é necessário que se faça a seleção dos espermatozóides móveis e saudáveis morfológicamente (sem defeitos de cauda ou na peça intermediária), além de eliminar o plasma seminal e células indesejáveis que possam estar presentes no ejaculado, sendo feita então a separação espermática.

Durante as FIVs acompanhadas durante o estágio, essa separação foi realizada pelo método gradiente descontínuo de Percoll®, um dos mais utilizados na PIV. O Percoll® é um meio comercial, composto por partículas de sílica (15 a 30mm) recobertas por polivinilpirrolidona, preparado em diferentes densidades que selecionam os espermatozóides através da centrifugação. A técnica consiste em adicionar a dose do sêmen que será utilizado em um tubo contendo Percoll® a duas densidades, sendo a camada inferior de 90% e a superior de 45%. Essa separação é possível em função dos espermatozóides possuírem densidade diferente de células bacterianas, epiteliais e leucócitos, tornando assim, possível sua separação de outros componentes do ejaculado. Além disso, os espermatozóides, viáveis e móveis, se dirigem em direção à força centrífuga e formam um *pellet* mais rápido que os imóveis (MORREL, 2006). Dessa forma, a porção espermática a ser utilizada na fecundação encontra-se na porção inferior de Percoll®, na densidade de 90%. De acordo com Pertoft, H. (2000), as frações da seleção espermática se apresentam como na figura 15.



Fonte: Da autora (2021)

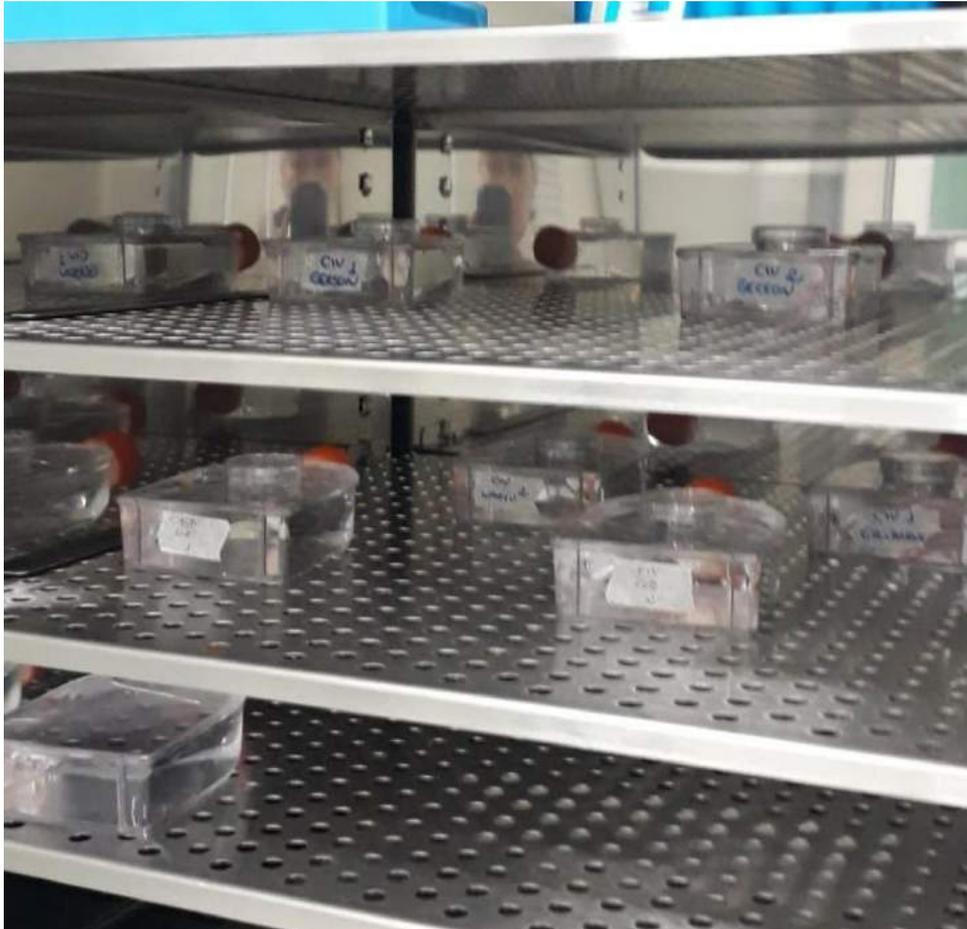
Para que o espermatozóide seja capaz de fecundar o oócito, ele deve antes ser capacitado. Essa capacitação, de forma *in vivo*, ocorre no útero da fêmea quando o espermatozóide entra em contato com substâncias do trato reprodutivo da fêmea, ocasionando modificações bioquímicas como mudança no teor lipídico e fluidez da membrana plasmática, tornando possível a ligação da membrana do espermatozóide com a zona pelúcida do oócito, onde irá ocorrer a reação acrossômica, que consiste na liberação de enzimas hidrolíticas presentes no acrossoma, enzimas estas que degradam a zona pelúcida e permitem finalmente a fusão das membranas do espermatozóide e do oócito. Na PIV, para que essa capacitação ocorra, as substâncias capazes de promover as mudanças bioquímicas necessárias encontram-se no meio de fecundação utilizado no processo. Na Embryoplus, as substâncias presentes no meio FIV capazes de promover a capacitação espermática são heparina e PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina).

Depois de selecionado e capacitado, o sêmen é colocado nas placas onde se encontram os oócitos para que ocorra a fecundação propriamente dita. Espermatozoides e oócitos permanecem juntos (co-cultivo) de 18 a 22 horas, em atmosfera a 5% de CO₂, com umidade saturada e temperatura de 39°C.

3.1.5 Cultivo *in vitro* (CIV)

A etapa de cultivo compreende o desenvolvimento do zigoto até blastocisto, estágio no qual já pode ser inovulado nas receptoras. O CIV tem duração de 6 dias e é realizado com atmosfera com alta tensão de oxigênio à 5% CO₂, à temperatura de 39°C, em incubadora de bancada convencional (Figura 16).

Figura 16 – Embriões em fase de FIV e CIV em incubadora



Fonte: Instagram Embryoplus Brasil

O CIV é uma das etapas mais críticas da PIV, sendo considerada uma das mais limitantes na produção de embriões, fazendo-se necessário atentar a todos os fatores que possam influenciar o desenvolvimento do zigoto. Dentre estes fatores, podemos citar: a osmolaridade do meio; tensão de oxigênio; temperatura; pH e a concentração dos componentes do meio de cultivo (fatores de crescimento, proteínas, citocinas, aminoácidos, carboidratos, lipídeos e ácidos graxos). Portanto, é mais interessante o uso de meios definidos, que supera os demais em termos de riscos sanitários e problemas no metabolismo embrionário. Porém, na prática, o que se vê é que os meios biológicos (indefinidos) apresentam melhores resultados em termos de produção de blastocistos (PARAMIO, 2010; SOUZA-FABJAN et al., 2014), fazendo-se necessário mais estudos e desenvolvimento de novos meios para CIV de ovinos.

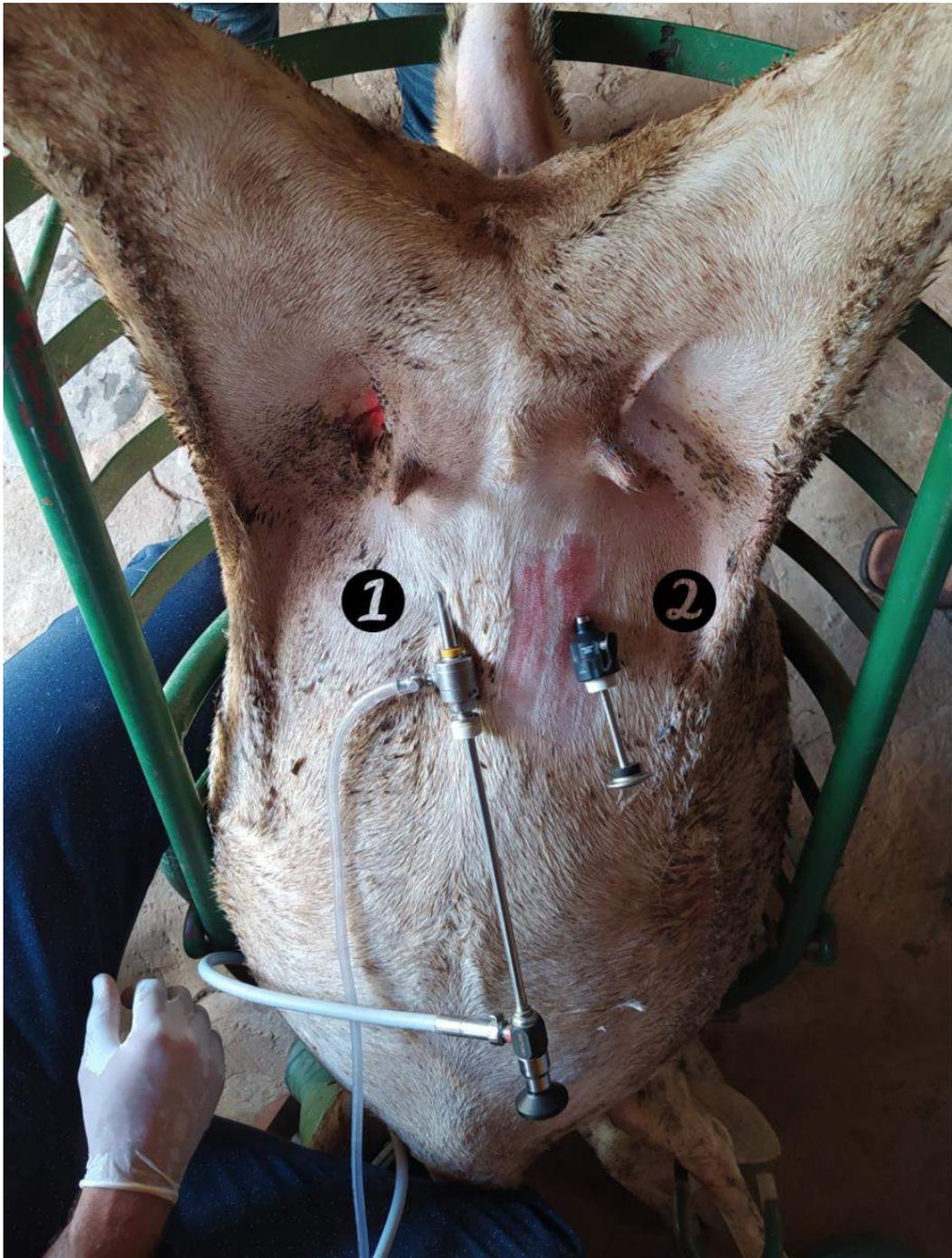
O meio de cultivo era trocado duas vezes durante o CIV. A troca de 50% desse meio é chamada de *feeding*, sendo realizado em D3 e D5.

3.1.6 Inovulação Dos Embriões

A inovulação dos embriões se refere à deposição dos embriões produzidos no trato reprodutivo da fêmea receptora. Segundo Fonseca et al. (2011), a técnica mais utilizada para a inovulação de embriões ovinos é a semi laparoscópica, sendo esta a realizada durante o desenvolvimento do presente estágio. O uso do laparoscópio nessa ocasião permite visualizar os ovários, avaliar a resposta ao protocolo hormonal utilizado e quantificar os corpos lúteos (CL), assim como em qual lado o CL funcional se encontra.

Neste procedimento, a receptora recebe uma anestesia local, é contida em maca específica, faz-se a tricotomia no local onde o corno uterino será exposto e é então posicionada em ângulo de 45°. São feitas duas incisões no animal (Figura 17). A primeira é onde será estabelecido o pneumoperitônio e onde o laparoscópio será inserido para localização e avaliação da resposta ovulatória. A segunda é onde será inserida uma pinça atraumática para manipulação do trato reprodutivo (BARIL et al. 1995), e por onde é feita a exposição do corno uterino, ipsilateral ao corpo lúteo funcional, para a inovulação do embrião. Quando exposto, o corno é lavado com soro e, com a ajuda de um cateter, é feita a inovulação do embrião no lúmen uterino através de uma sonda (tom-cat), bem próximo a junção útero-tubárica da fêmea (Figura 18).

Figura 17 – Incisões para inovulação de embriões



1. Ótica do laparoscópio; 2. Portal para pinça atraumática e exposição do corno uterino

Fonte: Da autora (2021)

Figura 18 - Inovulação do embrião em corno exposto.



Fonte: da autora (2021)

Os embriões inovulados podem ser congelados (se estiverem em qualidade para congelamento, ou seja, blastocisto expandido) ou a fresco. Na Embryoplus Brasil, nos procedimentos realizados com ovinos, as inovulações foram feitas

apenas com embriões a fresco devido ao número de receptoras, não restavam embriões produzidos para congelar, já os bovinos eram inovulados tanto a fresco quanto embriões DT (DirectTransfer), que são congelados lentamente com o auxílio de uma máquina de congelamento (Figura 19) e depois imersos em nitrogênio líquido e armazenados. O diferencial do embrião DT está no descongelamento, que pode ser realizado como se fosse uma dose de sêmen para IA, bastando descongelar e transferir/inovular o embrião, gerando praticidade.

Figura 19 – Embriões envasados na máquina de congelamento



Fonte: Da autora (2021)

3.2 Diagnóstico de gestação

Além da PIV, outro procedimento muito realizado durante o período do estágio foi o diagnóstico de gestação. O ultrassom é uma ótima ferramenta de diagnóstico para detectar a gestação de maneira precoce, permitindo um ajuste na alimentação desde o começo da prenhez, permitindo que o feto se desenvolva bem e, conseqüentemente, as ovelhas vazias tenham chance de engravidarem

novamente o mais rápido possível. Este serviço é realizado tanto nas ovelhas da própria cabanha, quanto em outros rebanhos de outras propriedades do Brasil.

O modelo do ultrassom usado é o DP 2200 da Mindray, com probe de frequência de 5 MHz. Trata-se de ultrassonografia bidimensional realizada com transdutor transretal linear.

Segundo Moraes et al. (2008), os primeiros sinais de gestação observados em ovelhas através de ultrassonografia ocorrem por volta do 15° dia, quando é possível observar líquido no útero. Porém, só isso não é o suficiente para um diagnóstico exato. Então, o recomendado para se confirmar a prenhez é que o exame seja realizado a partir do 24° dia, período em que já é possível observar o feto e seu batimento cardíaco. A partir do 20° dia já é possível visualizar os placentônios do feto (Figura 20), e a partir do 30° dia já pode ser feita a diferenciação da cabeça e do tronco (Figura 21).

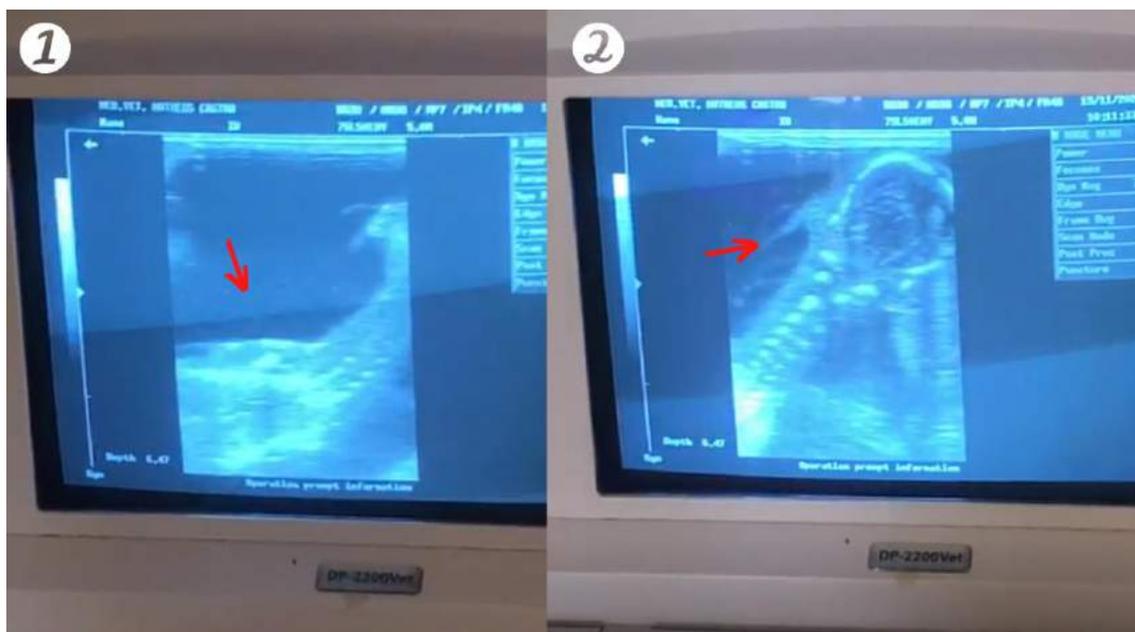
Nos diagnósticos realizados, as fêmeas são mantidas em posição quadrupedal, contidas cranialmente sob os cuidados de uma pessoa. Outra pessoa auxilia o supervisor na realização do ultrassom, levantando cuidadosamente o abdômen do animal quando solicitado (Figura 22). A finalidade é aproximar o útero do transdutor transretal e promover uma melhor visualização intrauterina.

Figura 20 – Imagem de ultrassom com placentônios



Fonte: Da autora (2021)

Figura 21 – Imagem de ultrassom com diferenciação de cabeça e tronco



1.Ultrassonografia indicando o tronco do feto; 2.Ultrassonografia indicando a cabeça do mesmo feto na foto 1.

Fonte: Da autora (2021)

Figura 22 – Realização do diagnóstico de gestação



Fonte: Da autora (2020)

Figura 23 – Lote para diagnóstico de gestação



Fonte: Da autora (2021)

4 CABANHA LUXOR

A Cabanha Luxor, gerida pela médica veterinária Carolina Caretta, trabalha com ovinos de genética superior, das raças Dorper (Figura 24) e White Dorper (Figura 25), sendo estas raças trabalhadas almejando sempre o melhoramento genético dos animais da cabanha. Tanto o Dorper como o White Dorper são animais originados na África do Sul, sendo os cruzamentos utilizados Dorset Horn x Blakhead Persian e Dorset Horn x Van Roy, respectivamente. Atualmente a cabanha possui cerca de 270 animais, sendo em sua maioria animais P.O. (puros de origem), mas com algumas matrizes meio sangue Santa Inês usadas como receptoras, ou seja, recebem embriões das doadoras P.O. e gestam estes embriões.

Figura 24 – Matriz e cordeiro da raça Dorper



Fonte: Instagram Cabanha Luxor

Figura 25 – Matrizes da raça White Dorper



Fonte: Instagram Cabanha Luxor

Os manejos diários vão, desde os cuidados com os cordeiros recém nascidos, até os animais mais velhos que já não participam de feiras e exposições, e que não são usados mais em procedimentos reprodutivos. Parte destes animais não são descartados como é feito na maioria dos criatórios por se tratarem de animais de alto valor genético e por um certo apego por parte dos proprietários, pois são animais que já levaram muitas premiações e reconhecimento para a cabanha.

4.1 Instalações

A Cabanha conta com infraestrutura adequada para a criação dos animais, dispondo de baias suficientes para o número de animais, quarentena e um galpão para procedimentos reprodutivos, como coleta de óocitos, inovulação de embriões e diagnóstico de gestação.

4.1.1 Baías

Na propriedade, os animais são contidos em baías coletivas com capacidade de ocupação que variam de acordo com seu tamanho. Ao todo, são 30 baías que comportam todos os animais da cabanha.

A escolha de qual baía cada um dos animais irá ocupar vai de acordo com sua categoria e fase de produção, formando lotes homogêneos em que todos os animais necessitem das mesmas atenções, dos mesmos manejos, da mesma alimentação, etc. Alguns exemplos desses critérios usados são: animais prenhes, fêmeas paridas, animais puros, animais meio sangue, fêmeas que passaram ou passarão por procedimentos reprodutivos, cordeiros desmamados, borregos com potencial genético para pista, reprodutores, fêmeas vazias, etc.

Todas as baías possuem cobertura para proteger os animais de adversidades climáticas como ventos fortes, chuvas de grandes proporções e raios solares muito intensos, contando com uma espécie de solário em sua maioria.

4.1.1.1 Solário

A maioria das baías conta com solário, variando o tipo de piso entre si. O solário nas instalações de ovinos tem a função de permitir que o animal se exercite e se exponha ao sol quando sentir vontade. Na cabanha, algumas baías possuem solário com piso de terra batida (Figura 26) e outras com *Brachiaria*. Neste último caso, não considera-se um piquete pois o tamanho de área com a forrageira é pequena, não sendo uma fonte de alimento expressiva na dieta dos animais.

Figura 26 – Baia de fêmeas paridas com solário de terra batida



Fonte: Da autora (2021)

4.1.1.2 Bebedouros e Comedouros

Os bebedouros de todas as baias são de polietileno e automatizados, permitindo que os animais tenham água fresca e limpa em todos os horários do dia. A limpeza destes bebedouros é realizada constantemente para retirar as sujeiras que ficam aderidas.

Já os comedouros variam de acordo com seu material. Na maioria das baias, os cochos são pré moldados de concreto (Figura 27), ocupando toda a extensão da baia nos corredores, e em algumas poucas baias, o cocho é feito com polietileno ou alvenaria.

Figura 27 – Baias com colcho pré-moldado de concreto



Fonte: Instagram Cabanha Luxor

4.1.1.3 *Creep-feeding*

O *creep-feeding* é uma espécie de cocho privativo que só os cordeiros têm acesso, sendo usado durante a fase de cria. O *creep* tem como objetivo desmamar cordeiros mais pesados através de suplementação alimentar com concentrado e volumoso.

Na cabanha, as baias de maternidade possuem *creep-feeding* (Figura 28) para que os cordeiros se alimentem ao longo do dia com comida à vontade. Os *creeps* são feitos com barras e/ou telas de metal que delimitam a altura dos animais que conseguem acessar o cocho. Todos os comedouros são de polietileno.

O alimento fornecido no *creep* é uma mistura de 50% de volumoso e 50% de concentrado. Como fonte de volumoso, usa-se o feno de alfafa moído e o concentrado usado possui cerca de 21% de PB. Procura-se manter o comedouro sempre com quantidade adequada de alimento.

Figura 28 – *Creep-feeding*



1.Exterior do *creep-feeding*; 2. Interior do *creep-feeding* com cocho limpo e cordeiros descansando.

Fonte: Da autora (2021)

4.1.2 Quarentena

Além das baias comuns, a cabanha possui mais três afastadas do restante do rebanho, as quais são usadas para quarentena de animais que chegam de outras propriedades ou para apartar do rebanho os animais que estejam doentes.

Nestas baias, os cochos são feitos de concreto pré-moldado, os bebedouros são automatizados iguais às baias comuns e a cama usada é a serragem.

4.1.3 Galpão de procedimentos reprodutivos e tosquia

A cabanha conta também com um galpão onde são realizados procedimentos de reprodução, como coleta de oócitos e inovulação de embriões, tosquia e qualquer outro que necessite de um espaço mais limpo e estéril que as baias onde os animais ficam.

Esse galpão é dividido em quatro 'baias', todas com chão de cimento e cochos pré moldados de concreto. Uma destas baias é exclusiva para a tosquia, nela, encontra-se apenas a mesa de tosquia (Figura 29) e os sacos onde a lã tosquiada é armazenada.

Figura 29 – Mesa para tosquia de ovinos



Fonte: Da autora (2021)

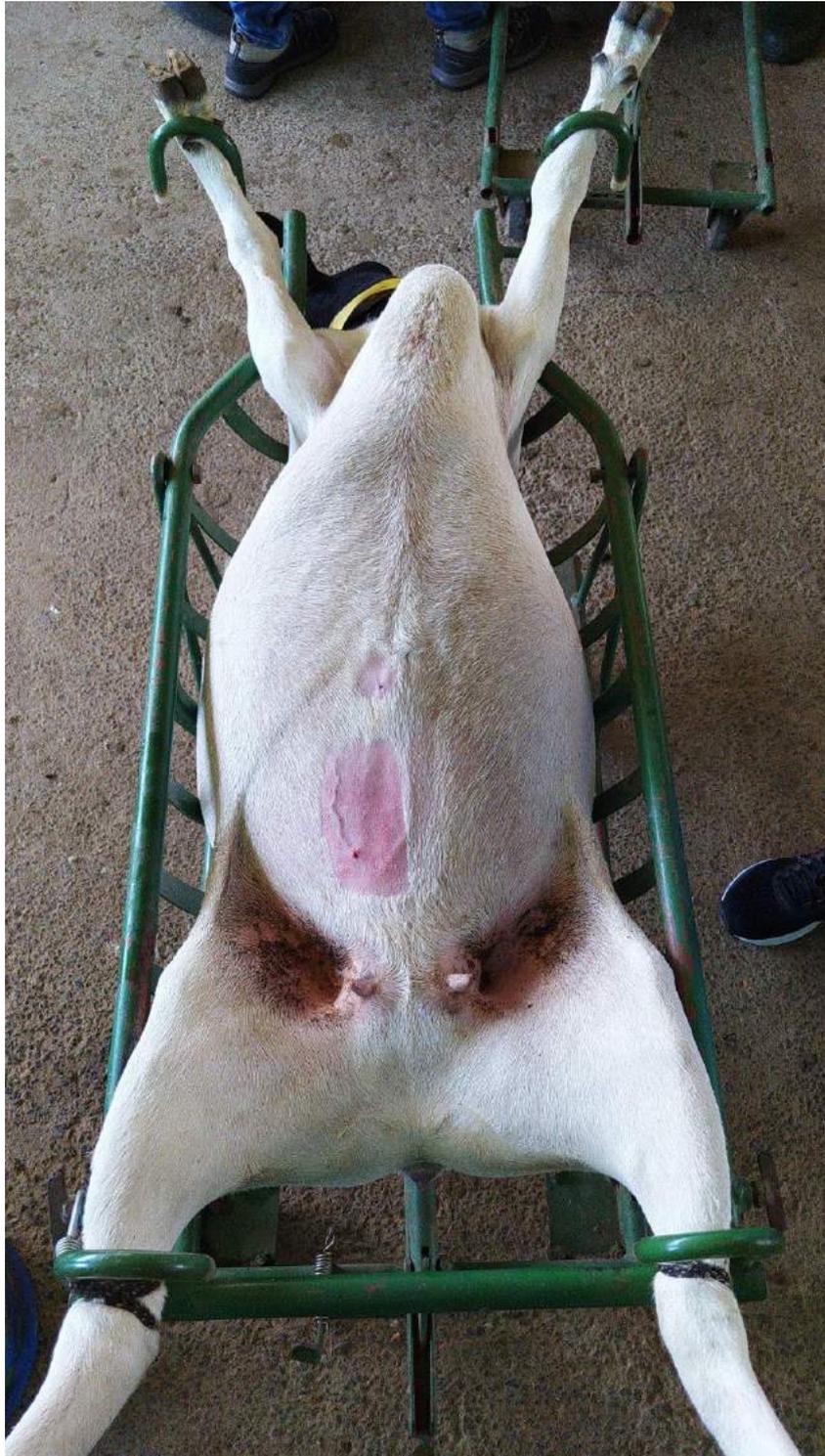
Outra baia é exclusiva para procedimentos reprodutivos, nela são realizadas as coletas de oócitos, inovulação dos embriões, alguma cirurgia que precise ser realizada, diagnóstico de gestação, entre outros. Esta baia conta com uma mesa cirúrgica veterinária (Figura 30), macas de contenção (Figura 31) e grades móveis para conter os animais (Figura 32).

Figura 30 - Mesa cirúrgica veterinária



Fonte: Instagram Cabanha Luxor

Figura 31 - Fêmea contida em maca de contenção



Fonte: Da autora (2021)

Figura 32 – Matrizes White Dorper aguardando a LOPU contidos com grade móvel



Fonte: Da autora (2021)

As outras duas baias são usadas para apartar os animais e conter os que já foram submetidos ao procedimento em questão.

4.2 Manejo alimentar e alimentação

A nutrição adequada de todos os animais é de fundamental importância para que expressem o seu máximo potencial produtivo e reprodutivo. Na cabanha, os animais são alimentados duas vezes ao dia, sendo o primeiro trato às 7 horas e o segundo às 16 horas. Antes do trato ser colocado nos cochos, as sobras são retiradas e jogadas.

Sabe-se que a depender da fase de produção que o animal se encontra, suas exigências nutricionais de PB, NDT, consumo de matéria seca e minerais se modificam, seja aumentando ou diminuindo, e para que todos os animais do rebanho tenham suas exigências atendidas, é necessário fazer modificações na composição do alimento fornecido.

Na cabanha, os animais são alimentados com a mesma formulação de ração independente se estão prenhes, em lactação, em crescimento ou manutenção, alterando apenas a quantidade de concentrado fornecida a depender de sua categoria ou fase de produção. Essa padronização pode ser prejudicial tanto nutricionalmente quanto financeiramente, pois dependendo da exigência da categoria, a proporção dos ingredientes usados na dieta mudam. Em casos onde usa-se mais concentrado que o necessário para atender as exigências dos animais, gasta-se mais dinheiro e ocasiona excesso de proteína no organismo do animal, fazendo com que esse excesso seja armazenado como gordura e que seja eliminado muito nitrogênio no ambiente. Porém, apesar dessa padronização do alimento para todos os animais, nota-se que os animais se desenvolvem muito bem, em sua maioria todos com ECC adequados e nenhum animal subnutrido, mas tendo talvez uma produção abaixo do que deveriam, seja em questão de músculo, leite, expressão genética, etc.

A dieta dos animais consiste em capim elefante picado e concentrado, ou silagem de milho e concentrado quando o capim não está com uma qualidade muito boa, como em época da seca e com muito colmo, sendo essa silagem adquirida fora da propriedade. As porcentagens de concentrado e volumoso que compõem a alimentação não são muito exatas, a proporção utilizada para a mistura do alimento fornecido é de 4 baldes de volumoso para 1 balde de concentrado, sendo o concentrado usado com 21% de PB, o capim elefante com aproximadamente 7% de PB e a silagem com aproximadamente 7,18% de PB, segundo o BR-Corte 3 (2021). Como a silagem era adquirida de vários lugares e a qualidade do volumoso vindo de algumas propriedades deixava a desejar, o que acharam como solução foi adquirir uma compra grande de silagem e armazená-la em silo tipo bag.

Os animais 'convencionais', ou seja, matrizes já aposentadas, ovelhas que não são levadas para exposições e ovelhas meio sangue, consomem por dia cerca de 500g de concentrado, enquanto os animais de pista e em reprodução, comem cerca de 800g de concentrado. Não é possível saber a quantidade exata de proteína

fornechida nessas duas ocasiões pois o volumoso também apresenta proteína bruta, e não se sabendo qual a quantidade de volumoso que cada animal come, a PB final não pode ser estimada. Porém, sabendo-se a quantidade de concentrado fornechida, já dá para ter uma noção se a exigência está sendo suprida. Segundo o NRC (2006), as exigências de fêmeas em manutenção, que seriam da categoria que recebem 500g de concentrado, e as categorias de fêmeas no terço final de gestação e fêmeas em lactação (amamentando um cordeiro), que seriam as que recebem 800g, estão presentes na tabela 3.

Tabela 3 - Exigências de PB para ovinos em manutenção, gestação e lactação, segundo NRC 2006.

Categoria	Concentrado fornechido (g)	Exigência PB (%)	Exigência PB (g)	PB fornechida pelo concentrado (g)
Manutenção	500	7%	73,5	105
Gestação	800	11%	176	168
Lactação	800	14%	322	168

Fonte: Da autora (2021)

Ao se comparar a quantidade de PB exigida e a que é fornechida aos animais, utilizando o concentrado com 21% de PB e sem considerar o volumoso, nota-se que as fêmeas em manutenção recebem sim a quantidade exigida porém em excesso, o que faz com que haja um gasto financeiro além do necessário para alimentar essa categoria e acúmulo de proteína no organismo do animal, aumentando a eliminação de nitrogênio no ambiente e podendo ser armazenada em forma de gordura.

Já nas categorias de gestação e lactação, a quantidade de proteína ingerida não supre as exigências apenas com o concentrado fornechido. Na gestação, o déficit é pequeno, o que pode ser contornado com o volumoso a depender da quantidade que é fornechida, porém, para as fêmeas em lactação, o déficit é bem expressivo, sendo que apenas o volumoso, muito provavelmente, não consegue suprir o que falta devido ao seu baixo teor de PB. Esse déficit para lactantes é prejudicial pois para produzir leite suficiente, as fêmeas acabam mobilizando reservas corporais para suprir sua exigência, levando à perda de peso das matrizes, cordeiros

desmamados com peso inferior do ideal e até mesmo atraso no retorno ao cio dessas ovelhas, aumentando o intervalo entre partos.

Os cordeiros têm acesso ao *creep-feeding*, com alimentação à vontade a partir de 10 a 15 dias de vida. O alimento fornecido no *creep* é uma mistura de 50% de feno de alfafa moído e 50% de concentrado, com aproximadamente 18% e 21% de PB, respectivamente.

Todos os animais recebem sal mineral a vontade em um cocho separado em cada uma das baias.

4.3 Manejo Reprodutivo

Na cabanha, o manejo reprodutivo é feito com monta natural, na maioria das vezes, e com transferência de embriões, sejam ele produzidos por FIV ou MOTE. Como o objetivo da cabanha é a produção de animais de alta genética da raça Dorper e White Dorper, apenas os animais P.O. participam da monta natural, sendo as fêmeas mestiças utilizadas apenas como receptoras de embriões. Quando a monta natural é feita, as fêmeas que entrarão na estação de monta são selecionadas e transferidas para uma baia junto com o reprodutor selecionado (Figura 33). Esses animais são mantidos juntos por cerca de 30 dias, e logo que o macho é separado, é feito o diagnóstico de gestação para confirmar as que foram emprenhadas logo no começo da monta. As que tiverem prenhez negativa, são submetidas ao ultrassom novamente após 30 dias, sendo as prenhas confirmadas apartadas do lote e colocadas em baia separada.

Figura 33 – Reprodutor e matrizes Dorper em baia de monta natural controlada



Fonte: Instagram Cabanha Luxor

As fêmeas vazias são mantidas juntas, sendo decidido o que será feito com elas. Ou seja, se irão ficar com o macho novamente, se irão participar de algum procedimento reprodutivo, como coleta ou transferência de embriões, ou se seguirão vazias.

Outra maneira de emprenhar as fêmeas é através da PIV ou TE. Neste caso, tanto as fêmeas puras, quanto as mestiças são usadas, considerando que os embriões são obtidos de machos e fêmeas de raça pura e com alto valor genético. Para a realização da técnica, a inovulação é feita de acordo com o que foi descrito anteriormente, e as fêmeas são colocadas em uma única baia. As receptoras são mantidas com o menor estresse possível para que os embriões sejam implantados e se desenvolvam bem, evitando perda embrionária. Após 30 dias da inovulação é feito o diagnóstico de gestação, e as ovelhas com prenhez confirmada são

transferidas para a baia das prenhas. As vazias geralmente são colocadas junto com o macho para mais uma tentativa de engravidá-las.

O protocolo pré-parto utilizado pela cabanha é feito de 30 a 60 dias antes da previsão de parição. Neste protocolo, as fêmeas no 1/3 final da gestação são vacinadas com Excell10® e Paraven®, que conferem proteção contra doenças como tétano, gangrena gasosa, manqueira, enterotoxemia, hepatite necrótica infecciosa e botulismo. Além das vacinas, faz-se a aplicação de um endectocida para tratamento e controle de ectoparasitas e vermes. Assim que os cordeiros nascem, mãe e cria são transferidos para a baia dos animais paridos.

4.4 Manejo Dos Cordeiros

Assim que os cordeiros nascem, são transferidos, juntamente com sua mãe, para a baia de paridas. Após o parto, é observado se o cordeiro está mamando bem, afim de garantir que esteja consumindo a quantidade necessária de colostro. Logo após, o cordeiro é pesado, recebe um colar de identificação e esses dados, juntamente com a numeração da mãe, são anotados no caderno de controle dos animais.

A cura do umbigo dos cordeiros é feita apenas no dia do nascimento com iodo a 10%. Os cordeiros que não conseguem ser aleitados naturalmente são aleitados com leite de vaca fornecido na mamadeira ou, em alguns casos mais específicos quando o animal não consegue succionar a madeira, o leite é administrado por sonda. Sabe-se que o leite de vaca difere bastante do leite de ovelha em sua composição, fornecendo menor energia para que o cordeiro se desenvolva, sendo interessante enriquecer esse leite de vaca antes de fornecer aos cordeiros ou fornecer um sucedâneo adequado às crias. Mas apesar desta diferença de composição, os cordeiros se desenvolvem bem.

Todos os cordeiros são vacinados, com um protocolo de vacinação de 3 doses. A primeira dose é feita com Excell10® a partir da terceira semana de vida, sendo as duas outras feitas com a Glanvac® como reforço, com intervalo de 30 dias. As vacinas são responsáveis por controlar linfadenite caseosa e prevenir enterotoxemia (doença do rim polposo), tétano, doença negra, edema maligno (como carbúnculo) e carbúnculo. Além disso, juntamente com cada dose de vacina,

os cordeiros também são vermifugados com Baycox®, com dose de acordo com seu peso.

Outro manejo cotidiano com os cordeiros é a caudectomia. Este não é um manejo necessário quando se trata da raça Dorper por não serem animais muito lanados, porém adota-se esta prática por questões estéticas. Este procedimento pode ser feito de diversas formas. Na propriedade é realizado com a ajuda do alicate elastrador, onde é colocado nos cordeiros uma goma elástica na cauda entre a segunda e terceira vértebra caudal. Durante o período da colocação do elástico até que a cauda realmente caia, em torno de 7 dias, é aplicado larvicida no local da inserção do elástico para evitar miíases. As gomas usadas em cada animal não são reaproveitadas.

4.5 Manejos Rotineiros

Além dos manejos específicos citados, como em qualquer outro criatório, são realizados muitos manejos cotidianos e importantes. A observação dos animais é de fundamental importância para que se decida a realização ou não de determinados procedimentos, principalmente se tratando de saúde.

Todos os dias os animais são checados e observados para ver se existem problemas de diarreia, desidratação, se estão expressando algum comportamento atípico e etc. Em casos de diarreia, o animal recebe uma dose de Borgal® (antibiótico) e continua sendo observado para ver se houve melhora. Quando a diarreia é muito severa, ou então o animal está desidratado e fraco por alguma outra razão, é aplicado o soro Polijet® de acordo com peso e grau de desidratação.

Além destes comportamentos, os lotes são avaliados também quanto à necessidade de tosquia e de casqueamento. O lote que precisa ser tosquiado é levado para o galpão de procedimentos, e antes da tosquia são molhados afim de limpar um pouco da sua lã, e para facilitar e melhorar a eficiência da tosquiadeira, evitando o desgaste dos pentes. Neste momento que antecede o 'banho', os cascos são avaliados e, caso necessite, é feito o casqueamento. A tosquia (Figura 34) é feita com tosquiadeira elétrica (Figura 35) e o casqueamento (Figura 36) com tesoura própria para corte de casco de ovinos.

Figura 34 - Tosquia



A- Fêmea adquirida de outra propriedade molhada antes da tosquia; B- Mesma fêmea após a tosquia.

Fonte: Da autora (2021)

Figura 35 – Tosquiadeira elétrica



Fonte: Google imagens

Figura 36 – Casqueamento



Fonte: Da autora (2021)

5. CONCLUSÃO

Ambas empresas contam com uma infraestrutura muito boa, equipamentos de qualidade e equipe capacitada que fazem com que o trabalho desenvolvido gere resultados muito positivos.

O estágio supervisionado realizado na Cabanha Luxor e na Embryoplus Brasil foi de muito aprendizado, com toda certeza minhas experiências nestas duas empresas contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal. Tive a oportunidade de acompanhar diversos procedimentos aprendidos na teoria durante a graduação e de colocar em prática os ensinamentos adquiridos ao longo da vida acadêmica.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como sugestão, a alimentação dos animais da cabanha poderia ser mais adequada e melhor calculada, com uma formulação mais precisa afim de evitar gastos desnecessários, acúmulo de gordura e garantir a máxima eficiência produtiva do rebanho, assegurando que todos os animais recebam todos os nutrientes na quantidade exigida por cada categoria.

O leite fornecido para os cordeiros que são aleitados na mamadeira também poderia ser substituído por sucedâneo ou leite de ovelha para que os cordeiros atinjam seu máximo desempenho até a desmama. Outra alternativa indicada seria enriquecer o leite de vaca que é fornecido com óleo de soja e ovo.

Os outros manejos são realizados de forma adequada, não havendo necessidade de mudanças radicais, apenas a manutenção e melhorias quando necessárias para que mantenham o trabalho de qualidade que exercem na área de ovinocultura e reprodução animal.

REFERÊNCIAS

- ACCARDO, C. et al. **Effect of recombinant FSH and LH on in vitro maturation of sheep oocytes**; embryo development and viability. *AnimReprod Sci*, v.81, p.77-86, 2004.
- AMIRIDIS, G.S.; CSEH, S. **Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants**. *AnimReprod Sci*, v.130, p.152-161, 2012.
- BALDASSARE, H. et al. **Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro production technologies**. *Theriogenology*, v.57, p.275-284, 2002.
- BALDASSARRE, H. et al. **Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis**. *Animal Reproduction Science*, v.35, p.145-150, 1994.
- BALDASSARRE, H. et al. **In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis**: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology*, v.45, p.707-717, 1996.
- BALDASSARRE, H. **Tecnologias reprodutivas de última geração**. In: Aisen EG. *Reprodução ovina e caprina*. São Paulo: MedVet, 2008. p.179-183.
- BARIL, G. et al. **Synchronization of estrus in goats**: the relationship between eCG binding in plasma, time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology*. v.45, p.1553-1559, 1995.
- BERNARDI, M.L. **Produção in vitro de embriões ovinos**. *Acta SciVet*, v.33, p.1-16, 2005.
- CHAVES, R.M. et al. **Efeito do diâmetro folicular sobre a qualidade dos oócitos obtidos de ovários de ovelhas (*Ovis aries*) e cabras (*Capra hircus*)**. *Ciência Animal Brasileira*. 11(3):683-688, 2010.
- COCERO, M.J. et al. **The efficiency of in vitro ovine embryo production using an undefined or a defined maturation medium is determined by the source of the oocyte**. *ReprodDomestAnim*, v.46, p.463-470, 2011.
- COGNIÉ, Y. et al. **State-of-the-art production, conservation and transfer of invitro-produced embryos in small ruminants**. *ReprodFertil Dev*, v.16, p.437-445, 2004.
- CORDEIRO, M.F. et al. **Reproductive efficiency of adult and prepubertal goats subjected to repeated follicular aspiration**. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66:137-144, 2014.
- FAO. FAOSTAT [Dados do rebanho ovino efetivo brasileiro de 1999 a 2019]. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Acesso em: 06 fev 2021.

FONSECA, J. F.; OLIVEIRA, M. E. F.; VIANA, J. H. M. **Uso de procedimentos não cirúrgicos para a produção, recuperação e inovulação de embriões em pequenos ruminantes.** Rev. Bras. Reprod. Anim [online] v. 35, n. 2, p.113 -117, 2011

FONSECA, J. F. da; SOUZA, J. M. G. de; CAMARGO, L. S. A. **Estado da arte de ovócitos e embriões de caprinos e ovinos: passado, presente, futuro.** Acta ScientiaeVeterinariae, Porto Alegre, v. 38, p. 353-369, 2010.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal.** 2. Ed. São Paulo: Roca, p. 395, 2008.

GRAFF, K. J. et al. **Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats.** Theriogenology. v. 51, p. 1099-1119, 1999.

GULER, A. et al. **Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes.** Theriogenology. 54: 209-218, 2000.

ISHWAR, A.K.; MEMON, M.A. **Embryo transfer in sheep and goats: a review.** Small Ruminants Research, 19(1):35-43, 1996.

MORAES, E.P.B.X.et al. **Avaliação ultra-sonográfica do desenvolvimento embrionário-fetal de ovinos da raça Santa Inês.** CiênAnim Bras, v.9, p.148-155, 2008.

MORRELL, J. **Update on semen technologies for animal breeding.** Reproduction in Domestic Animals, v. 40, p.1-5, 2006.

PARAMIO, M.T. **In vivo and in vitro embryo production in goats.** Small Rumin Res, v.89, p.144-148, 2010.

PAULA, N. R.O. et al. **Embriões caprinos produzidos in vitro ou in vivo: técnicas, problemas e perspectivas.** Revista Brasileira de Reprodução Animal. Belo Horizonte, v. 32, p. 21-35, 2008.

PERTOFT, H. **Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll.** Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 44(1-2), 1-30, 2000.

RODRÍGUEZ, C. et al. **Ovum pick-up in sheep: a comparison between different aspiration devices for optimal oocyte retrieval.** Reproduction in Domestic Animals, v.41, p.106-113, 2006.

ROMÃO, R. et al. **Evaluation of two methods of in vitro production of ovine embryos using fresh or cryopreserved semen.** Small Rumin Res, v.110, p.36-41, 2013.

SHIRAZI, A.et al. **The effect of macromolecule source and type of media during in vitro maturation of sheep oocytes on subsequent embryo development.** J ReprodInfertil, v.13, p.13-19, 2012

SOUZA-FABJAN J.M.G.et al. **In vitro production of small ruminant embryos: late improvements and further research.** Theriogenology, v.81, p.1149- 1162, 2014.

SOUZA, T.T.S. **Produção in vitro de embriões ovinos na presença de cafeína e vitamina E.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina, p.75. 2015.

TEIXEIRA, P.P.M.; PADILHA, L.C.; OLIVEIRA, M.E.F. **Laparoscopic ovum collection in sheep:** gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. Animal Reproduction Science, 127: 169-175, 2011.

TEIXEIRA, P.P.M. et al. **Aspiração Folicular.** In: OLIVEIRA, M.E.F.; TEIXEIRA, P.P.M.; VICENTE, W.R.R. **Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos.** 1ª. ed. São Paulo: MedVet, p. 147-153, 2013.

WANI NA. **In vitro maturation an in vitro fertilization of sheep oocytes.** Small Rumin Res, v.44, p.89-95, 2002

WANI, N.A. et al. **Effect of oocyte harvesting techniques on in vitromaturation and in vitro fertilization in sheep.** Small Rumin Res, v.36, p.63-67, 2000.

WIECZOREK, J.et al. **A new concept in laparoscopic ovum pick-up (OPU) in sheep** – efficiency of method and morphology of recovered oocytes. Animal Science, 10(1):39-48, 2010.