



JÚLIA DE OLIVEIRA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO
NA EMPRESA CANTO PORTO EXPORTAÇÃO DE
EMBRIÕES LTDA**

**LAVRAS – MG
2021**

JÚLIA DE OLIVEIRA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA EMPRESA
CANTO PORTO EXPORTAÇÃO DE EMBRIÕES LTDA**

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. Dr. Hugo Shisei Toma
Orientador

**LAVRAS – MG
2021**

JÚLIA DE OLIVEIRA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA EMPRESA
CANTO PORTO EXPORTAÇÃO DE EMBRIÕES LTDA**

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.

APROVADA em 26 de Novembro de 2021.

Msc. Amanda Guimarães da Silva FMVZ/USP – Campus Pirassununga

Ma. Susiandra Kloster Munhoz FMVZ/UNESP – Campus Botucatu

Prof. Dr. Hugo Shisei Toma
Orientador

**LAVRAS – MG
2021**

*À vó Helena, vô Catirina e à tia Izabel,
que estão ao lado de Deus.
Com todo meu amor e saudade.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora Aparecida, que me guiaram, me protegeram e me deram forças para seguir em direção ao meu propósito.

Aos meus pais, Kátia e José Geraldo, pelo amor, educação e cuidado constante. Nenhuma palavra é capaz de expressar minha gratidão por todos os esforços que vocês fizeram para que esse sonho se tornasse real.

À vó Helena (in memoriam), exemplo de fé, sabedoria e bondade. Obrigada pelas orações, tenho certeza que a senhora continua a me guardar aí do céu.

Ao vô José Catirina (in memoriam), por me provar que com caráter, humildade e trabalho, podemos alcançar todos os nossos objetivos.

À vó Gessy, por me encorajar a desfrutar de todas as oportunidades que surgiram e ainda vão surgir.

À minha irmã Brenda, por ser exemplo de determinação e responsabilidade. Obrigada por dividir a vida comigo.

À toda minha família, pela torcida e incentivo, que foram fundamentais durante essa trajetória.

Aos meus amigos de Pimenta, que apesar da distância, estiveram junto comigo e torceram por mim.

Aos amigos que Deus me concedeu durante essa caminhada, obrigada pelos momentos compartilhados.

À Marcela e a Ana Beatriz, minhas companheiras da graduação. Obrigada por dividirem as alegrias e dificuldades comigo durante a caminhada.

À Isabelle, amizade que a reprodução animal me proporcionou. Obrigada pela troca de experiências e por partilhar seus conhecimentos comigo.

A todos os lugares que abriram as portas para que eu pudesse estagiar. Em especial, à Tulipa Agropecuária e toda sua equipe, por me proporcionarem boas amizades e tantos aprendizados, não só profissionais, mas também pessoais.

À CPEX Embriões, por me conceder a oportunidade de realizar o estágio supervisionado, por todas as experiências, aprendizados e pela convivência durante esse período.

Aos professores, que se dedicam a missão de ensinar, por partilhar seus conhecimentos com tamanha maestria.

Ao meu orientador Hugo Shisei Toma, exemplo de profissional e professor. Obrigada por aceitar o meu convite para a orientação e por sempre estar disponível para me ajudar durante esse processo.

À Amanda Guimarães e à Susiandra Kloster, profissionais admiráveis. Obrigada por aceitarem o convite para compor a banca e pela disponibilidade em participar desse momento tão importante para mim.

À Universidade Federal de Lavras, por me permitir fazer parte dessa instituição, que me formou não só como profissional, mas também como pessoa.

À Medicina Veterinária, minha melhor escolha. Profissão honrosa, que prometo exercer com muita dedicação, orgulho e amor.

MUITO OBRIGADA!

*“Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.” (Fernando Pessoa).*

RESUMO

O estágio supervisionado, lotado na disciplina PRG107, é parte das exigências para conclusão do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras. Visando contemplar a carga horária prática da referida disciplina, o estágio foi realizado na empresa Canto Porto Exportação de Embriões LTDA, no período de 03/05/2021 a 31/07/2021, sob supervisão do Médico Veterinário Douglas Gaitkoski e orientação do professor Dr. Hugo Shisei Toma, totalizando 504 horas. Durante o período supracitado, foram acompanhadas atividades inerentes à biotecnologia de produção *in vitro* de embriões, como a aspiração folicular, seleção de oócitos, sincronização da ovulação de receptoras, transferência de embriões e diagnóstico de gestação. O presente trabalho objetiva apresentar as experiências desta vivência prática, assim como discutir os aspectos técnicos relacionados as atividades desenvolvidas com base na literatura científica. A realização do estágio e a elaboração deste relatório permitiu a ampliação dos conhecimentos teóricos e práticos, assim como a criação de novas relações pessoais, fundamentais para o desenvolvimento pessoal, profissional e para a consolidação da formação acadêmica.

Palavras-chave: Reprodução Animal. Produção *In Vitro* de Embriões. Biotecnologia.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Vista externa do laboratório de PIVE da empresa CPEX | 15 |
| Figura 2 – Laboratório de PIVE da empresa CPEX. Sala de cultivo de embriões. (A) incubadoras de cultivo; (B) capela de fluxo laminar | 15 |
| Figura 3 – Laboratório de PIVE da empresa CPEX. Antessala (A) e sala de lavagem e esterilização | 16 |
| Figura 4 – Deslocamento por veículo automobilístico (A) e aéreo (B), para prestação de serviços nos estados de São Paulo e Goiás, respectivamente | 16 |
| Figura 5 – Esquema demonstrativo da seqüência de realização das atividades de acordo com os dias (D) | 17 |
| Figura 6 – Equipamentos de ultrassom para utilizados realização das aspirações foliculares. (A) Mindray, DP2200 VET; (B) IMV Imaging, ExaPad | 18 |
| Figura 7 – Esquema demonstrativo da recuperação de oócitos por meio da aspiração folicular guiada por ultrassonografia, com a utilização de sistema fechado e pressão negativa | 19 |
| Figura 8 – Imagem ultrassonográfica obtida durante OPU em doadora da raça Nelore, em propriedade localizada em Campinorte, Goiás | 20 |
| Figura 9 – Lote de novilhas doadoras da raça Gir, submetidas ao procedimento de aspiração folicular, em propriedade localizada no município de Pinhalzinho, São Paulo | 21 |
| Figura 10 – Realização de rastreamento e classificação de oócitos durante treinamento da equipe de aspiração | 26 |
| Figura 11 – Classificação dos oócitos | 27 |
| Figura 12 – Ficha de aspiração folicular | 28 |
| Figura 13 – Fazendas nos Estados do Rio de Janeiro (A) e São Paulo (B), onde foram realizados os protocolos de sincronização da ovulação | 32 |
| Figura 14 – Protocolo de sincronização da ovulação utilizado | 33 |
| Figura 15 – Manejo de sincronização (D0) realizado em propriedades na região de Bom Jesus do Itabapoana, Rio de Janeiro | 33 |
| Figura 16 – Fêmeas Nelore e cruzadas (1/2 Nelore x 1/2 Angus) utilizadas como receptoras durante programa de TETF, em propriedade localizada no município de Bataguassu, Mato Grosso do Sul | 36 |
| Figura 17 – Desenvolvimento embrionário normal em bovinos | 39 |

| | |
|---|----|
| Figura 18 – TETF realizada em propriedade localizada no município de Bataguassu, Mato Grosso do Sul | 41 |
| Figura 19 – Receptoras submetidas ao diagnóstico de gestação (D30), em propriedade localizada na regional de Nhandeara, São Paulo | 43 |
| Figura 20 – Imagem ultrassonográfica obtida durante diagnóstico de gestação positivo (D30), com presença do embrião (hiperecogênico) circundado por líquido amniótico (anecóico), em propriedade localizada na região de Nhandeara, São Paulo | 43 |
| Figura 21 – Imagens ultrassonográficas de sexagem fetal precoce a partir da identificação e localização do tubérculo genital. A – macho; B – fêmea | 45 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 – Quantidade de procedimentos, oócitos recuperados e média de oócitos totais e viáveis por OPU, de acordo com a raça das doadoras aspiradas durante o período de estágio | 22 |
| Quadro 2 – Critérios de classificação de oócitos adotados pela equipe da CPEX Embriões ... | 27 |
| Quadro 3 – Classificação dos embriões proposta pela IETS por código de dois dígitos, de acordo com o estágio de desenvolvimento e qualidade embrionária | 40 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1 – Número absoluto e relativo de procedimentos de OPU realizados durante o período de estágio, de acordo com a localização das propriedades por Estado | 22 |
| Gráfico 2 – Número absoluto e relativo de doadoras submetidas a OPU durante o período de estágio de acordo com a categoria | 24 |
| Gráfico 3 – Número absoluto e relativo de doadoras submetidas a OPU durante o período de estágio de acordo com o <i>status</i> reprodutivo | 25 |
| Gráfico 4 – Número absoluto e relativo de receptoras que foram sincronizadas para TETF de acordo com a regional | 30 |
| Gráfico 5 – Número absoluto e relativo de receptoras que foram sincronizadas para TETF de acordo com a categoria animal | 30 |
| Gráfico 6 – Número absoluto e relativo de receptoras que foram sincronizadas para TETF durante o período de estágio de acordo com o grupo genético | 31 |
| Gráfico 7 – Número absoluto e relativo de embriões à fresco e criopreservados inovulados durante o período de estágio em programa de TETF | 37 |
| Gráfico 8 – Número absoluto e relativo de receptoras diagnosticadas como gestantes e não gestantes no diagnóstico de gestação realizado aos 30 dias | 44 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 DESCRIÇÃO GERAL DO LOCAL DE ESTÁGIO | 13 |
| 2.1 <i>A empresa e os serviços prestados</i> | 13 |
| 2.2 <i>Quadro de funcionários</i> | 13 |
| 2.3 <i>Instalações e recursos</i> | 14 |
| 3 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS | 17 |
| 3.1 <i>Aspiração folicular</i> | 17 |
| 3.2 <i>Seleção de óocitos</i> | 25 |
| 3.3 <i>Sincronização da ovulação de receptoras</i> | 29 |
| 3.4 <i>Transferência de embriões</i> | 36 |
| 3.5 <i>Diagnóstico de gestação</i> | 42 |
| 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 47 |
| REFERÊNCIAS | 48 |

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, é notório o aumento no uso de biotecnologias da reprodução em bovinos, como a transferência de embriões (TE). A aplicação dessas tecnologias possibilita uma maior eficiência reprodutiva, assim como o melhoramento genético do rebanho, o que impacta positivamente na produtividade, tanto no segmento da carne como do leite (SARTORI et al., 2016).

Em relação a produção e transferência de embriões, em 2019 foram produzidos um total de 304.269 embriões, consolidando o país como o segundo maior produtor de embriões bovinos do mundo. Desse total, 93,8% foram obtidos por meio da técnica de produção *in vitro* (PIVE) e 54,4% da produção total foi direcionada para atender rebanhos leiteiros (VIANA, 2021).

A disciplina PRG107, lotada no décimo módulo do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, tem por finalidade a realização do estágio supervisionado, o que permite ao graduando vivenciar o exercício da profissão em suas diversas áreas de atuação. O conteúdo programático compreende uma carga horária total de 476 horas, dividida em atividades práticas (408 horas) e teóricas (68 horas).

Diante do exposto e visando contemplar a carga horária prática, foi desenvolvido o estágio na área de reprodução animal, especificadamente na biotecnologia de PIVE. As atividades foram executadas na empresa Canto Porto Exportação de Embriões LTDA (CPEX), no período de 03/05/2021 a 31/07/2021, totalizando 504 horas, sob supervisão do Médico Veterinário Douglas Gaitkoski e orientação do professor Dr. Hugo Shisei Toma.

O relatório que se segue tem por objetivo atender as exigências finais para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária, apresentar as experiências pessoais e profissionais resultantes da vivência prática durante o período supracitado, assim como discutir as atividades desenvolvidas com base na literatura científica.

2 DESCRIÇÃO GERAL DO LOCAL DE ESTÁGIO

2.1 A empresa e os serviços prestados

A Canto Porto Exportação de Embriões LTDA (CPEX), é uma empresa privada, fundada em Janeiro de 2021, a partir da associação entre o grupo Canto Porto e outros quatro sócios com experiência prévia no mercado de embriões. Localizada na Fazenda São Francisco, Vicinal Amador Jorge Siqueira Franco, km 2, Bairro Soares, Mogi Mirim, São Paulo, a cerca de 170 km da capital do Estado.

Especializada na produção *in vitro* de embriões bovinos, atua no desenvolvimento e implementação de projetos de melhoramento genético em rebanhos de leite e corte. A proposta é uma aliança entre embriões PIV e tecnologia de dados, visando uma gestão profissional e eficiente e almejando à pecuária de alta precisão, com o objetivo de proporcionar o nascimento de animais saudáveis e geneticamente superiores.

Os serviços prestados se concentram na aspiração folicular, PIVE, sincronização da ovulação de receptoras, transferência de embriões, diagnóstico de gestação e sexagem fetal. Além das atividades citadas, a empresa ainda realiza a comercialização de embriões das raças Gir, Girolando e Nelore, produzidos a partir de doadoras de parceiros fornecedores de genética, como a Canto Porto, a Tulipa Agropecuária e a CV Nelore Mocho.

2.2 Quadro de funcionários

A CPEX conta com uma equipe composta por 16 profissionais, sendo 08 Médicos Veterinários, 02 técnicos em agropecuária, 02 assistentes administrativos, 02 especializados em *marketing*, 01 profissional de tecnologia da informação (TI) e 01 auxiliar de serviços gerais. A empresa ainda dispõe do auxílio dos funcionários de outras duas entidades jurídicas, a FFlores Consultoria e a Norte Agro Soluções Agropecuárias, localizadas no Mato Grosso do Sul e no Goiás, respectivamente, que prestam apoio para o comércio, distribuição e transferência dos embriões nesses Estados.

Entre os Médicos Veterinários, são 05 técnicos de laboratório, que são responsáveis pela rotina geral do laboratório e por todos os processos relacionados à PIVE, e quando necessário, dão suporte à equipe de campo no envase dos embriões. Outros 03 profissionais atuam na aspiração folicular (01) e na realização de protocolos de sincronização, transferência de embriões e diagnóstico de gestação (02) e são encarregados das funções de planejamento e

realização dessas atividades, assim como pela organização dos materiais e equipamentos necessários.

Os técnicos em agropecuária exercem o cargo de auxiliar de aspiração e acompanham o Médico Veterinário designado para a execução dessa atividade. São responsáveis pela seleção dos oócitos, confecção de relatórios e pela intermediação com a equipe de laboratório, para a preparação dos tubos de maturação oocitária e entrega do material coletado.

A auxiliar de serviços gerais, é responsável pela limpeza e higienização do laboratório e suas dependências. Já os demais funcionários, atuam internamente na sede e dão suporte em questões administrativas, na compra de suprimentos, documentação fiscal, na tecnologia e processamento de dados, assim como na criação dos conteúdos de divulgação da empresa no *website* e nas redes sociais.

2.3 Instalações e recursos

A estrutura física conta com laboratório para PIVE, dotado de antessala, sala de cultivo de embriões, sala de lavagem e esterilização, sala e armários externos para estoque de materiais e cilindros de gás. Além do laboratório, há uma sede administrativa, provida de um escritório, onde são alocados os funcionários e também de uma sala de reuniões, onde a equipe se reúne para discussão dos projetos e dos resultados obtidos. Parte dessas instalações são apresentadas pelas Figuras 1, 2 e 3.

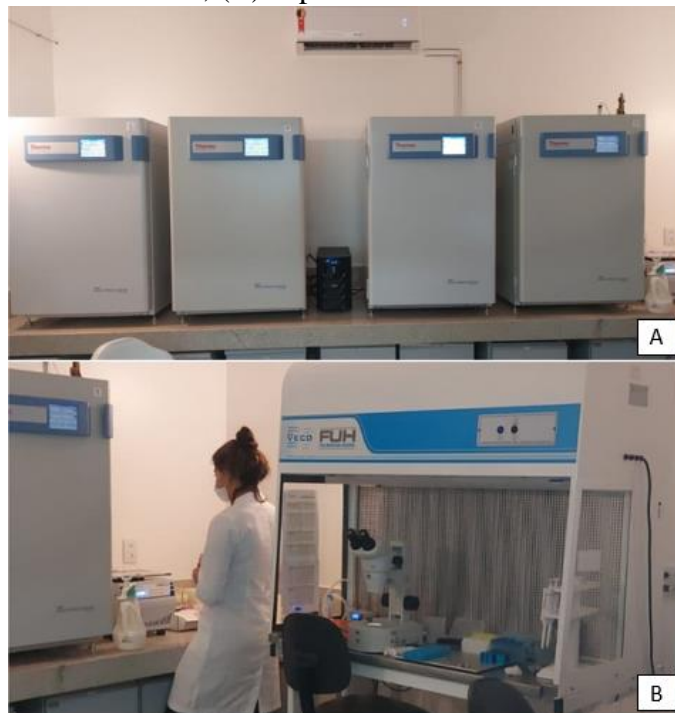
Como a CPEX presta seus serviços em propriedades situadas em todo o território nacional, para o transporte dos funcionários durante as viagens, eram disponibilizados 02 carros fretados. No caso de trajetos mais longos, o deslocamento era realizado por transporte aéreo, com embarque no Aeroporto Internacional de Viracopos, localizado em Campinas, São Paulo (FIGURA 4). Os gastos com combustível, passagens, hospedagem e alimentação eram custeados pela empresa.

Figura 1 – Vista externa do laboratório de PIVE da empresa CPEX.



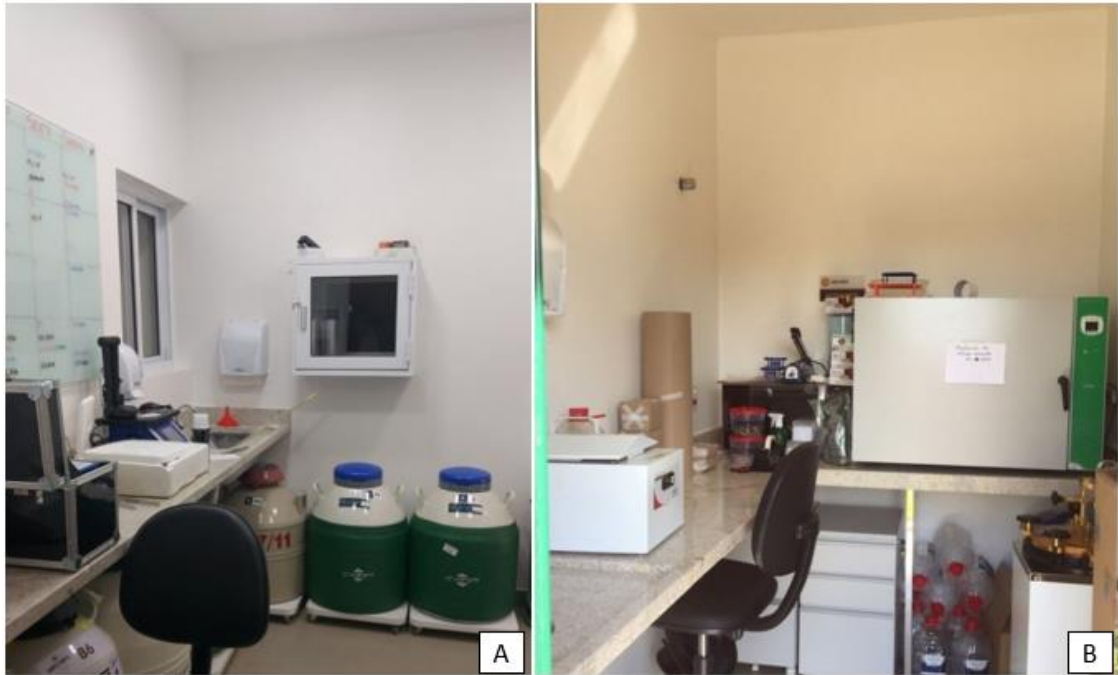
Fonte: Do autor (2021).

Figura 2 – Laboratório de PIVE da empresa CPEX. Sala de cultivo de embriões. (A) incubadoras de cultivo; (B) capela de fluxo laminar.



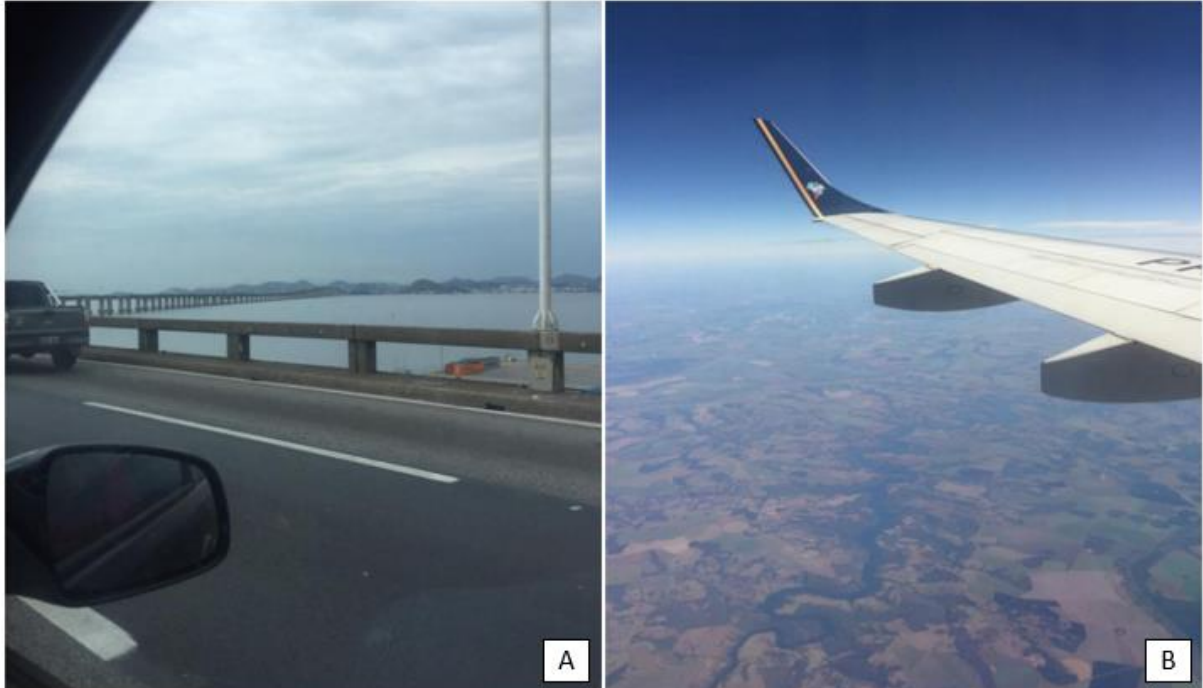
Fonte: Do autor (2021).

Figura 3 – Laboratório de PIVE da empresa CPEX. Antessala (A) e sala de lavagem e esterilização (B).



Fonte: Do autor (2021).

Figura 4 – Deslocamento por veículo automobilístico (A) e aéreo (B), para prestação de serviços nos estados de São Paulo e Goiás, respectivamente.



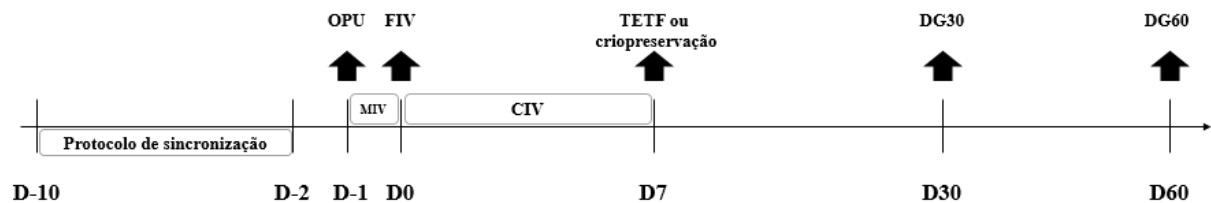
Fonte: Do autor (2021).

3 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O estágio supervisionado foi realizado entre 03/05/2021 e 31/07/2021, com carga horária de 40 horas semanais, totalizando 504 horas, sob a supervisão do Médico Veterinário Douglas Gaitkoski e orientação do docente Dr. Hugo Shisei Toma, lotado no Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (DMV/UFLA).

Durante o período supracitado, foram acompanhadas as seguintes atividades: aspiração folicular, seleção de oócitos, sincronização de receptoras, transferência de embriões e diagnóstico de gestação. As tarefas eram designadas em esquema de rodízio, de modo que quando ocorriam de forma simultânea, a estagiária era destinada a acompanhar àquela que ainda não tinha vivenciado. A ordem cronológica em que essas atividades eram realizadas é esquematizada na Figura 5.

Figura 5 – Esquema demonstrativo da sequência de realização das atividades de acordo com os dias (D).



Legenda: OPU: *Ovum Pick Up*; MIV: maturação *in vitro*; FIV: fertilização *in vitro*; TETF: transferência de embrião em tempo fixo; DG: diagnóstico de gestação.

Fonte: Do autor (2021).

3.1 Aspiração folicular

A *Ovum Pick Up* (OPU) ou aspiração folicular via transvaginal guiada por ultrassonografia, é na atualidade o método para obtenção de oócitos imaturos de fêmeas bovinas (OLIVEIRA; SARAPIÃO; QUINTÃO, 2014). A técnica, inicialmente descrita na década de 80, viabiliza a recuperação dos gametas femininos de forma menos invasiva, diferentemente das abordagens cirúrgicas empregadas até então, como a laparotomia e a laparoscopia, possibilitando a recorrência do procedimento (ZANIN, 2013).

Aliada à produção *in vitro* de embriões (PIVE), a OPU permite a obtenção de oócitos, que posteriormente, serão submetidos a etapas de maturação, fertilização e cultivo em ambiente laboratorial controlado, resultando no desenvolvimento de embriões, que podem ser inovulados à fresco ou criopreservados (ZANIN, 2013).

Para a realização das aspirações, o Médico Veterinário contava com dois equipamentos ultrassonográficos, sendo o primeiro da marca Mindray, modelo DP2200 VET e o segundo, da IMV Imaging, modelo ExaPad. Ambos os aparelhos possuem transdutores microconvexos multifrequenciais, variando de 5,0 a 8,0 MHz e 5,0 a 7,5 MHz, respectivamente (FIGURA 6).

Figura 6 – Equipamentos de ultrassom para realização das aspirações foliculares. (A) Mindray, DP2200 VET; (B) IMV Imaging, ExaPad.



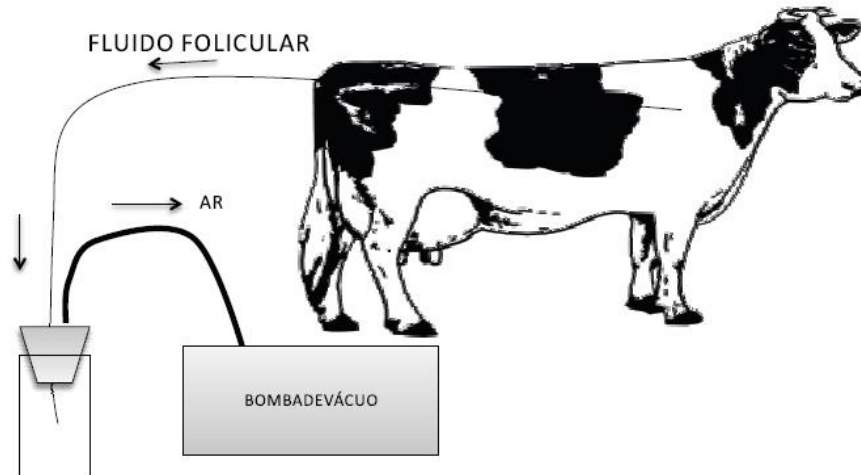
Fonte: Do autor (2021).

No primeiro ultrassom, a probe era acoplada a uma guia de aspiração folicular convencional, fechada com o auxílio de parafusos. Já no segundo aparelho, o transdutor era permanentemente selado na guia de OPU, o que facilitava a higienização após o uso. Adicionalmente, essa última possui um diâmetro reduzido, o que de acordo com o fabricante, permite a recuperação de oócitos em bezerras a partir dos cinco meses de idade.

Na parte superior da guia, era inserido um mandril com um cateter Jelco de calibre 18G na extremidade, que por sua vez, era conectado a um sistema estéril de aspiração folicular. Esse sistema faz a ligação da agulha a um tubo cônico de 50 ml, contendo 5 ml de solução tampão fosfato salino modificado por Dulbecco (DMPBS), previamente aquecida a 37,7°C e com adição de 20 µl de heparina sódica (5000 UI/ml), onde era depositado o conteúdo aspirado. Na

rolha de alumínio, colocada na borda superior do tubo, além do sistema, também era conectada uma mangueira de pressão negativa, gerada por uma bomba de vácuo com pressão ajustada a 70 mmHg, o que possibilita o fluxo do conteúdo aspirado ao longo do circuito (FIGURA 7).

Figura 7 – Esquema demonstrativo da recuperação de oócitos por meio da aspiração folicular guiada por ultrassonografia, com a utilização de sistema fechado e pressão negativa.



Fonte: Oliveira; Sarapião; Quintão (2014).

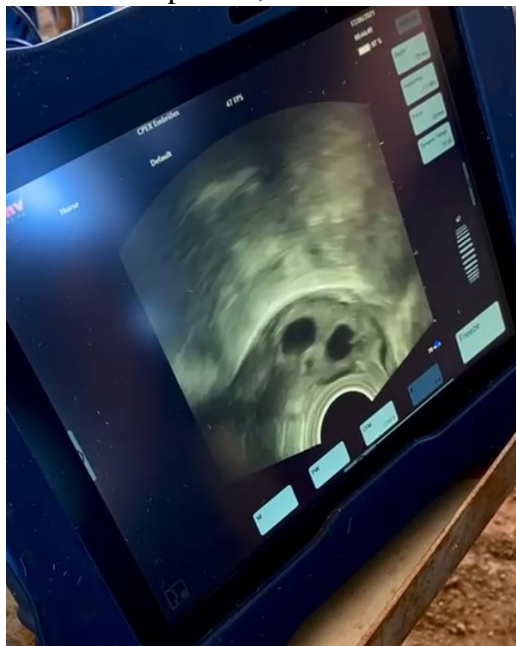
Precedente a OPU, com o animal devidamente contido, era realizada a anestesia epidural caudal, a partir da administração de anestésico local injetável sem vasoconstritor (Cloridrato de Lidocaína a 2%) no espaço intervertebral sacrococcígeo (entre a quinta vértebra sacral e a primeira vértebra coccígea) ou intercoccígeo (entre a primeira e a segunda vértebra coccígea). Para isso, eram utilizadas agulhas hipodérmicas com calibre 40x12 mm acopladas às seringas descartáveis de 5 ml.

A dosagem utilizada era de aproximadamente 0,2 mg/kg. O volume proposto para o bovino adulto varia entre 5 e 6 ml, em torno de 1 ml/100 kg (VALVERDE; SINCLAIR, 2017). Nos animais da raça Gir, a dosagem era determinada de forma mais cautelosa, visto que aparentemente apresentavam maior sensibilidade ao anestésico, evoluindo para paresia dos membros pélvicos e/ou decúbito em alguns casos, o que foi observado em dois animais durante o período do estágio.

Essa técnica anestésica é conhecida por bloqueio epidural baixo e é frequentemente utilizada nas abordagens ginecológicas que abrangem vulva e vagina, em que o animal permanece em estação (VALVERDE; SINCLAIR, 2017). O objetivo desse procedimento é diminuir as contrações do trato gastrointestinal, bem como abrandar o incômodo gerado pela punção folicular (ZANIN, 2013).

Prestes a iniciar a OPU, a guia de aspiração era revestida por uma camisinha sanitária contendo gel condutor na extremidade interna e em seguida, era inserida na vagina do animal. Através da palpação retal, os ovários eram identificados e posicionados em contato com o transdutor, permitindo assim, sua visualização ultrassonográfica. Uma vez que a bomba de vácuo estava ativada, o mandril era manipulado de modo a atravessar a parede do fundo vaginal, atingindo os folículos com diâmetro ≥ 2 mm presentes nos ovários (FIGURA 8). Dessa forma, os oócitos eram aspirados, conduzidos pelo sistema e depositados no tubo coletor contendo DMPBS.

Figura 8 – Imagem ultrassonográfica obtida durante OPU em doadora da raça Nelore, em propriedade localizada em Campinorte, Goiás.



Fonte: Do autor (2021).

Ao final do procedimento, o sistema era lavado por meio da aspiração da mesma solução contida nos tubos cônicos descrita anteriormente. Essa etapa de lavagem tem por objetivo a recuperação de células possivelmente aderidas ao sistema e/ou ao cateter (SENEDA et al., 2001). Em seguida, a camisinha sanitária, a agulha e o tubo eram substituídos. O tubo contendo o fluido folicular era identificado com informações relacionadas ao número/nome do animal, categoria, *status* reprodutivo, escore de condição corporal (ECC) e raça e destinado ao laboratório de campo, onde realizava-se o rastreamento e a seleção dos oócitos.

Durante a realização da OPU, eram atribuições da estagiária auxiliar na contenção dos animais quando necessário, realizar a técnica de anestesia epidural, acompanhar o procedimento por meio da observação das imagens ultrassonográficas, assim como dar suporte na montagem

e posterior higienização dos equipamentos, na reposição de materiais e na condução dos tubos de coleta para o laboratório.

No decorrer do período de estágio, foram realizados 708 procedimentos. Desse total, foram recuperados 15.678 óocitos e destes, 11.746 (75%) foram classificados como viáveis. Os animais eram previamente selecionados pelos clientes e não foi utilizado nenhum protocolo farmacológico prévio para manipulação do ciclo estral (FIGURA 9).

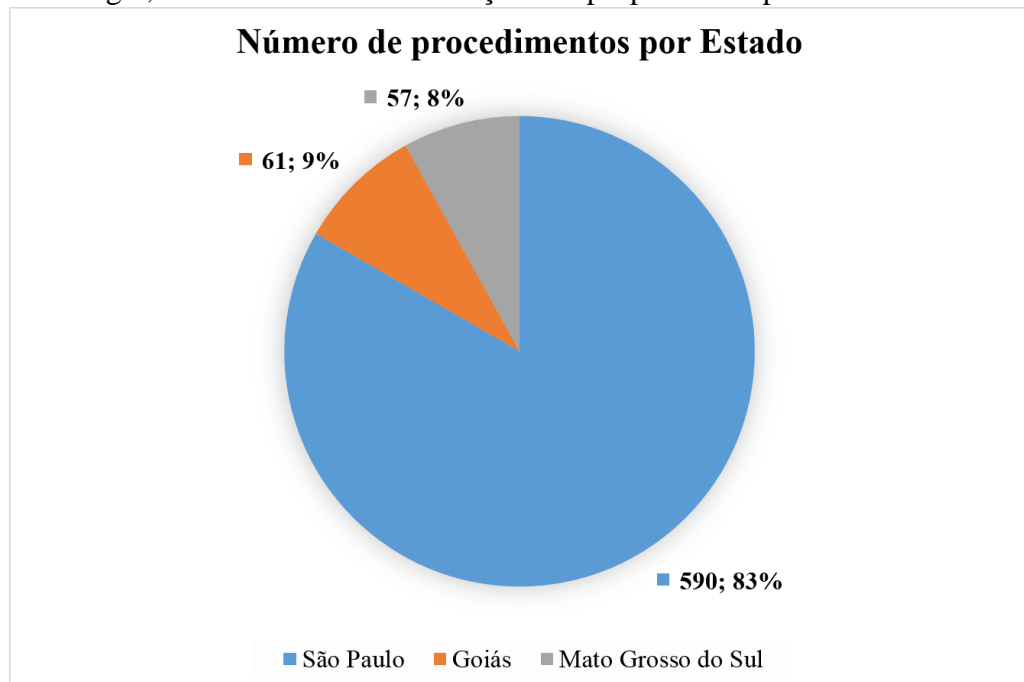
Figura 9 – Lote de novilhas doadoras da raça Gir, submetidas ao procedimento de aspiração folicular, em propriedade localizada no município de Pinhalzinho, São Paulo.



Fonte: Do autor (2021).

As aspirações foram realizadas em 07 propriedades distintas, localizadas nos Estados de São Paulo (05), Goiás (01) e Mato Grosso do Sul (01). O Gráfico 1, mostra o número de procedimentos feitos por Estado. Já na Tabela 1, são apresentados os dados referentes a quantidade de células recuperadas de acordo com a raça das doadoras, assim como a média por procedimento realizado.

Gráfico 1 – Número absoluto e relativo de procedimentos de OPU realizados durante o período de estágio, de acordo com a localização das propriedades por Estado.



Quadro 1 – Quantidade de procedimentos, oócitos recuperados e média de oócitos totais e viáveis por OPU, de acordo com a raça das doadoras aspiradas durante o período de estágio.

| Raça | Número de OPUs | Oócitos totais | Média totais/OPU | Oócitos viáveis | Média viáveis/OPU |
|-------------------------|----------------|----------------|------------------|-----------------|-------------------|
| Gir | 423 | 7412 | 17,5 | 5557 | 13,1 |
| Nelore | 144 | 3937 | 27,3 | 3022 | 21 |
| Girolando $\frac{3}{4}$ | 103 | 2995 | 29,1 | 2218 | 21,5 |
| Girolando $\frac{1}{2}$ | 38 | 1334 | 35,1 | 949 | 25 |
| Total | 708 | 15678 | 22,1 | 11746 | 16,6 |

Fonte: Do autor (2021).

As vacas zebuínas tendem a ter um desempenho superior na OPU/PIVE quando comparadas as vacas taurinas, o que é justificado por diferenças na fisiologia reprodutiva entre esses dois grupos genéticos. Um exemplo disso, é o fato de fêmeas *Bos indicus* apresentarem um maior número de ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral quando comparado a fêmeas *Bos taurus*. Além disso, os zebuínos apresentam um maior número de folículos

recrutados por onda. Acredita-se que isso se deve as maiores concentrações plasmáticas do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) (BARUSELLI; GIMENES; SALES, 2007).

Outra justificativa para a melhor resposta de doadoras zebuínas está relacionada com a melhor adaptação desses animais a ambientes com temperaturas mais elevadas, típicos de regiões de clima tropical como o Brasil. Em estudos de Rocha et al. (1998), vacas taurinas apresentaram comprometimento na qualidade oocitária e no desenvolvimento *in vitro* quando expostas a ambientes de alta temperatura. Em contrapartida, fêmeas zebus não manifestaram alterações na morfologia dos oócitos e na produção dos blastocistos no verão quando comparado ao inverno.

Em um experimento desenvolvido por Gimenes e colaboradores (2015), novilhas Nelore exprimiram uma maior quantidade de células do complexo cumulus-oócito (CCOs) totais e viáveis recuperados, quando comparado a novilhas europeias e bubalinas, e conseqüentemente, apresentaram um melhor desempenho na PIVE, evidenciado pela maior produção de embriões.

Em outro estudo, o número médio de oócitos totais e viáveis de vacas Nelore foi de 30,84 ($\pm 0,88$) e 23,35 ($\pm 0,7$), respectivamente. Porém, constatou-se uma ampla variação no número de células recuperadas entre os animais do grupo experimental (PONTES et al., 2011). Entretanto, apesar da alta variabilidade, análises individuais descritas sugerem que a taxa de recuperação respeite um padrão regular, de alta repetibilidade durante a vida reprodutiva (BATISTA et al., 2014).

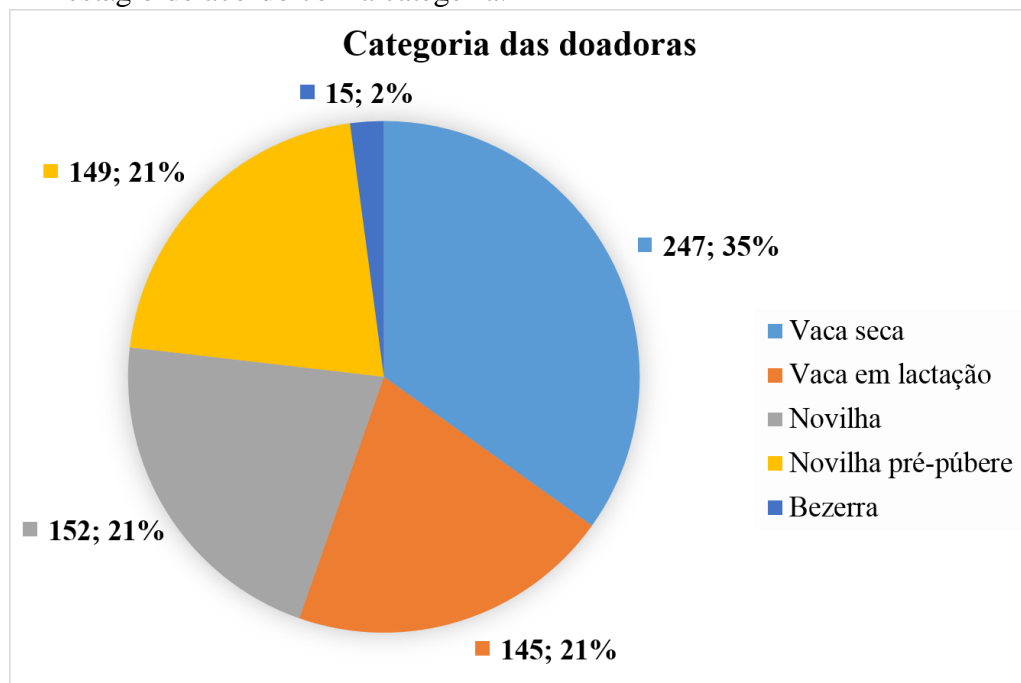
Levando em consideração as informações descritas anteriormente, assim como os trabalhos desenvolvidos relacionados a essa biotecnologia, é possível observar um grande interesse emergente na produção de embriões mestiços (*Bos taurus* x *Bos indicus*) para compor rebanhos leiteiros, visto que o cruzamento permite a associação entre alta produção e rusticidade (GRÁZIA, 2019).

De acordo com análises realizadas por Pontes e colaboradores (2010), vacas Gir apresentaram uma média de oócitos totais e viáveis por OPU de 17,1 ($\pm 4,5$) e 12,1 ($\pm 3,9$), respectivamente. A média foi maior quando comparada a vacas da raça Holandesa (11,4 \pm 3,9; 8,0 \pm 2,7). Contudo, a recuperação oocitária de doadoras cruzadas (1/2 Holandês-Gir) foi superior em relação aos resultados das raças puras, sendo na média 31,4 ($\pm 5,6$) totais e 24,3 ($\pm 4,7$) oócitos viáveis por procedimento. Não foram encontradas informações na literatura referente a produção de animais 3/4 Girolando a título de comparação com os dados obtidos durante o estágio.

O Gráfico 2 expõe a categoria dos animais que foram submetidos ao procedimento de aspiração folicular. O advento da avaliação genômica possibilitou o reconhecimento de animais

com elevado potencial genético de forma precoce e conseqüentemente, doadoras cada vez mais jovens estão sendo usadas em programas de OPU/PIVE. Bezerras *Bos taurus* e *Bos indicus*, submetidas ou não a protocolos de superestimulação com uso de FSH, apresentaram menor conversão de oócitos em blastocistos do que novilhas púberes da mesma raça (BARUSELLI et al., 2016).

Gráfico 2 – Número absoluto e relativo de doadoras submetidas a OPU durante o período de estágio de acordo com a categoria.



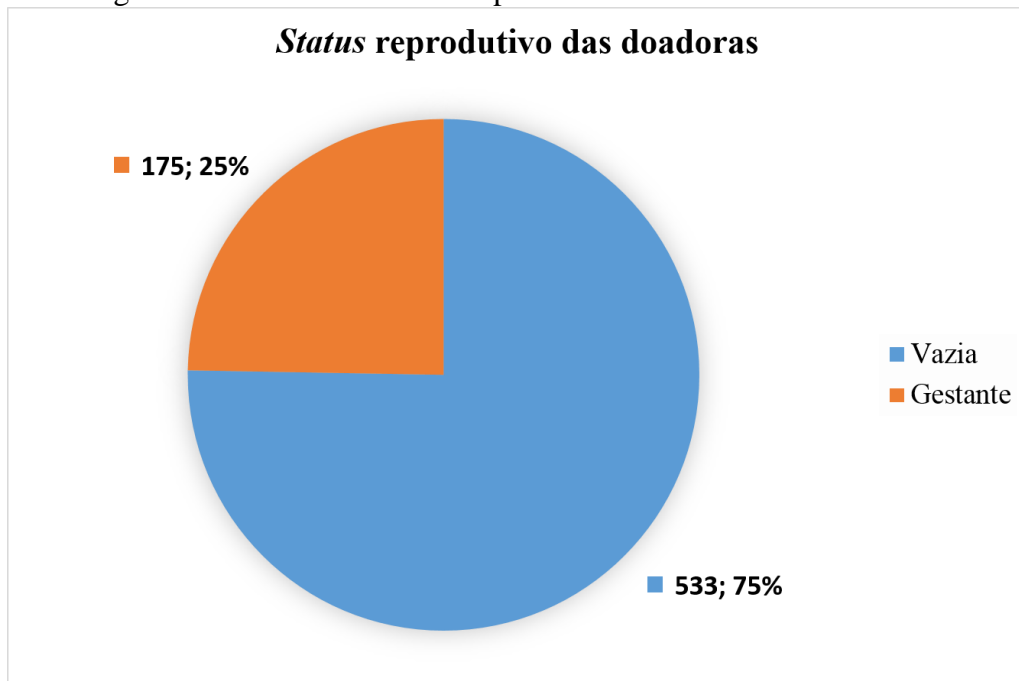
Fonte: Do autor (2021).

De forma semelhante, novilhas holandesas em fase pré-puberal demonstraram menor eficiência na PIVE quando comparadas a outras categorias (novilhas cíclicas, vacas em lactação e vacas secas). Nesse trabalho, não houve diferença significativa no número de oócitos recuperados entre os grupos, entretanto, doadoras pré-púberes tiveram taxa de clivagem e produção de embriões inferior às demais (GUERREIRO et al., 2014).

As vacas secas tiveram maior número de CCOs classificados como viáveis em comparação com às que estavam em período de lactação, sendo considerado o grupo mais eficiente (GUERREIRO et al., 2014). Em concordância, Vieira et al. (2014) relataram maior produção de embriões por doadoras que não estavam em lactação. As alterações metabólicas que ocorrem durante o período lactacional, relacionadas tanto a aspectos nutricionais quanto ao sistema endócrino, afetam diretamente a qualidade oocitária e conseqüentemente, os resultados da PIVE (BARUSELLI et al., 2016).

A porcentagem de doadoras gestantes e não gestantes é mostrada pelo Gráfico 3. Em relação ao estado reprodutivo, novilhas holandesas gestantes produziram mais embriões por procedimento de OPU quando comparado a novilhas pré-púberes e cíclicas da mesma raça (BARUSELLI et al., 2016). A recuperação de oócitos pode ser realizada nos três meses iniciais da gestação (ZANIN, 2013). Na prática, era realizada até quando fosse possível a manipulação dos ovários.

Gráfico 3 – Número absoluto e relativo de doadoras submetidas a OPU durante o período de estágio de acordo com o *status* reprodutivo.



Fonte: Do autor (2021).

Assim, é possível destacar que os resultados da OPU associada a PIVE estão condicionados a diversos fatores, dentre eles a técnica, a individualidade de cada doadora, bem como os procedimentos adotados durante o período de cultivo dos embriões (GRÁZIA, 2019). Para obter bons resultados na recuperação dos oócitos, a técnica de aspiração folicular deve ser realizada por um técnico capacitado, de forma precisa, e para isso, é necessário não só treinamento, mas também prévios conhecimentos anatômicos do trato reprodutivo da fêmea bovina e de ultrassonografia.

3.2 Seleção de oócitos

No procedimento de rastreamento e seleção, primeiramente o fluido folicular era depositado em um mini filtro para oócitos com tela de nylon (100 micras). Com auxílio de uma

seringa de 20 ml acoplada a uma agulha hipodérmica 40x12 mm, jorrava-se solução DMPBS aquecida contra a tela do filtro, para que as células retidas durante a filtração fossem depositadas em uma placa Petri plástica (90x15 mm), onde os oócitos eram rastreados com auxílio de um microscópio estereoscópio binocular e pipeta (FIGURA 10).

Figura 10 – Realização de rastreamento e classificação de oócitos durante treinamento da equipe de aspiração.



Fonte: Do autor (2021).

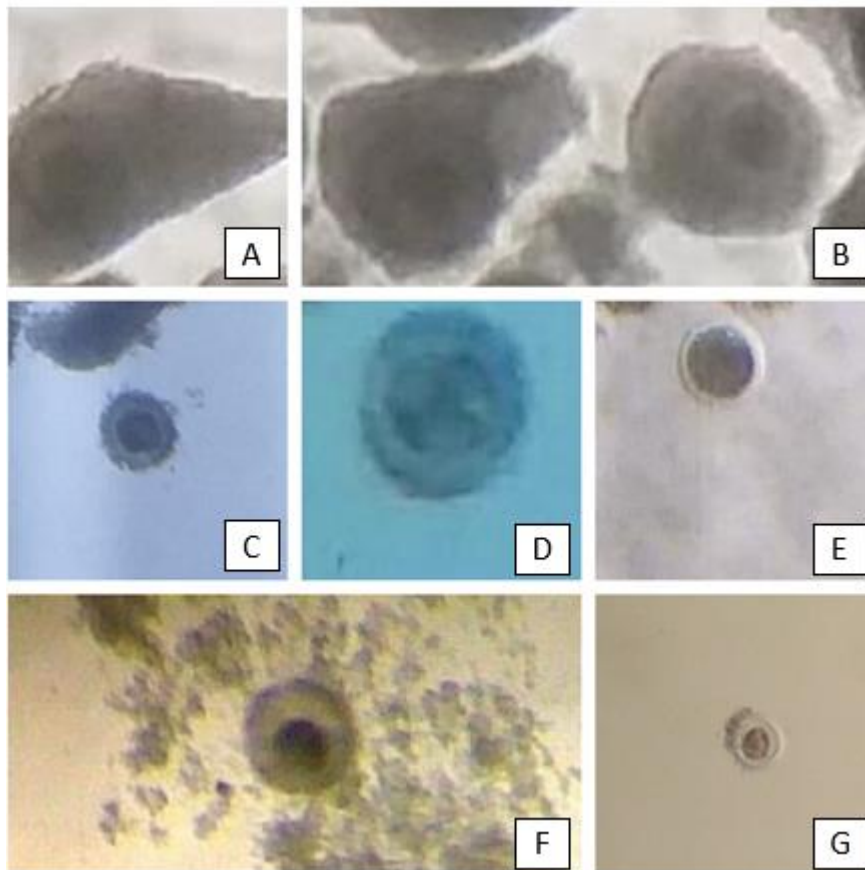
Posteriormente, os CCOs eram lavados três vezes em meio de lavagem e classificados morfológicamente. A avaliação é baseada nas características citoplasmáticas e no número de camadas de células do *cumulus* que circundam o oócito. Os critérios de classificação adotados pelos auxiliares de aspiração da CPEX são descritos na Tabela 2 e exemplificados pela Figura 11. Foram encontradas classificações distintas na literatura, no entanto, os parâmetros avaliados são os mesmos (SENEDA et al., 2001; VIANA et al., 2004).

Quadro 2 – Critérios de classificação de oócitos adotados pela equipe da CPEX Embriões.

| Classificação | Características |
|----------------------|---|
| Grau I | Cumulus compacto, com > 3 camadas celulares e citoplasma homogêneo. |
| Grau II | Cumulus compacto, quantidade inferior de camadas celulares em relação ao grau I (± 3) e citoplasma homogêneo. |
| Grau III | Cumulus compacto, quantidade inferior de camadas celulares em relação ao grau II (< 3) e citoplasma homogêneo. |
| Citoplasma irregular | Citoplasma heterogêneo, com presença de granulações. |
| Desnudo | Ausência de células do cumulus em torno da zona pelúcida. |
| Atrésico | Células do cumulus expandidas e citoplasma regular ou irregular. |
| Degenerado | Células do cumulus presentes ou não e citoplasma vacuolizado. |

Fonte: Do autor (2021).

Figura 11 – Classificação de oócitos.



Legenda: A – grau I; B – grau II; C – grau III; D – citoplasma irregular; E – desnudo; F – atrésico; G – degenerado.

Fonte: CPEX Embriões (2021).

Com exceção dos CCOs atresícos e degenerados, os demais eram submetidos a maturação *in vitro* (MIV) em criotubos preenchidos com 400 µl de meio MIV subposto de 250 µl de óleo mineral. Depois que os oócitos eram transferidos para o meio, era realizado controle de atmosfera gasosa através da passagem de gás mistura padrão primária (5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂) por 20 segundos. Em seguida, os tubos eram vedados por uma rolha previamente esterilizada, acondicionados em transportadora de oócitos aquecida a 38,5°C e remetidos ao laboratório, onde os processos subsequentes eram realizados.

Ao final do procedimento de seleção dos oócitos de cada doadora, o auxiliar de aspiração registrava as informações em uma ficha de OPU. Nesse relatório, eram registradas informações relacionadas a identificação do proprietário e dos animais, raça, categoria, *status* reprodutivo, ECC, avaliação da qualidade dos oócitos, assim como a quantidade de oócitos viáveis (grau I, II e III) e totais (viáveis somados aos classificados como citoplasma irregular e desnudo) e o horário do início da MIV (FIGURA 12).

Figura 12 – Ficha de aspiração folicular.

| Ficha de Aspiração Folicular - OPU | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|---------|------|------|-----------------------------------|--------|----------------|-------|----------------------|-------|--------------------|--------------------|----------------|-------|
| Proprietário: | | | | Fazenda: | | | | | | | | | |
| Data: 16-07-2021 | | | | Cidade: PINHALZINHO | | | | | | | | | |
| Responsável OPU: DOUGLAS | | | | Responsável Seleção: SEÃO TRIBURO | | | | | | | | | |
| Início OPU: 08:10 | | | | Final OPU: 11:00 | | | | | | | | | |
| Temperatura: | | | | Lote DPBS: 004/21 | | Lote Heparina: | | Temperatura chegada: | | Equipamento: 70-06 | | | |
| KENDIX | | | | | | | | | | | | | |
| Nº | Doadora | RGD | Raça | Cate. | Status | Tempo P+ | Score | Aval. Ov. | Touro | Raça | Viáveis | Total | Hora |
| 1 | | | GIR | VL | VZ | - | 3,50 | B | | | 27 | 40 | 08:17 |
| 2 | | | " | " | " | - | 3,50 | B | | | 5 | 14 | 08:24 |
| 3 | | | " | " | " | - | 2,50 | B | | | 22 | 46 | 08:35 |
| 4 | | | " | " | " | - | 3,50 | B | | | 28 | 39 | 08:46 |
| 5 | | | " | " | " | - | 4,00 | B | | | 2 | 5 | 08:49 |
| 6 | | | " | " | " | - | 3,50 | M | | | 10 | 17 | 08:58 |
| 7 | | | " | " | " | - | 3,00 | B | | | 45 | 51 | 09:13 |
| 8 | | | " | " | " | - | 3,00 | B | | | 14 | 25 | 09:28 |
| 9 | | | " | " | " | - | 3,00 | B | | | 23 | 27 | 09:33 |
| 10 | | | " | NOV | " | - | 3,00 | B | | | 12 | 17 | 10:02 |
| 11 | | | " | " | " | - | 3,50 | B | | | 38 | 45 | 10:11 |
| 12 | | | " | US | P+ | - | 3,50 | B | | | 14 | 19 | 10:18 |
| 13 | | | " | NOV | VZ | - | 3,00 | M | | | 6 | 8 | 10:25 |
| 14 | | | " | " | " | - | 3,00 | M | | | 23 | 27 | 10:33 |
| 15 | | | " | " | " | - | 3,50 | M | | | 7 | 19 | 10:43 |
| 16 | | | " | " | " | - | 3,00 | M | | | 26 | 36 | 10:51 |
| 17 | | | " | " | " | - | 3,00 | M | | | 14 | 18 | 10:58 |
| 18 | | | " | " | " | - | 4,00 | B | | | 20 | 25 | 11:06 |
| 19 | | | " | " | " | - | 3,50 | B | | | 26 | 31 | 11:14 |
| 20 | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | Total Viáveis: 362 | Total MIV: 509 | |
| Receptoras: | | OBS: | | | | | | | | | | | |
| Vitrificar: | | | | | | | | | | | | | |
| DT: | | | | | | | | | | | | | |

Fonte: Do autor (2021).

De acordo com o protocolo de produção utilizado, o tempo de MIV é de 22 a 24 horas e ao final desse período, os oócitos precisavam estar nas dependências do laboratório para

realização da fertilização *in vitro* (FIV). Dessa forma, por vezes era necessário o auxílio por parte da estagiária na logística de envio do material, visto que em algumas situações a equipe permanecia na propriedade ou se deslocava para outras localidades.

No que tange a realização da seleção de oócitos, é imprescindível que o auxiliar de aspiração detenha conhecimentos acerca da estrutura oocitária, para que seja capaz de identificar e diferenciar as células viáveis daquelas com conformação comprometida, e habilidade para o correto manuseio dos equipamentos, como o microscópio e as pipetas. Além disso, é importante que haja sincronia entre aspirador e auxiliar no ritmo de trabalho, para que o processo seja realizado de maneira eficiente.

Apesar de julgada como subjetiva, visto que varia conforme a prática do selecionador, a avaliação morfológica é um método pouco deletério, que preserva os oócitos viáveis para o emprego na PIVE. A qualidade dos CCOs é fundamental, uma vez que influencia no recomeço da divisão celular, no bloqueio à poliespermia, clivagem, desenvolvimento e implantação embrionária, entre outros processos imprescindíveis para que a técnica seja bem sucedida e resulte no nascimento de animais saudáveis (GRÁZIA, 2019).

3.3 Sincronização da ovulação de receptoras

A manipulação farmacológica do ciclo estral tem por objetivo a sincronização da ovulação, o que permite a execução de biotécnicas reprodutivas como a inseminação artificial e a transferência de embriões em tempo fixo (IATF e TETF, respectivamente), realizadas em um momento previamente estipulado, excluindo a necessidade de observação do estro (D'ÁVILA et al., 2019).

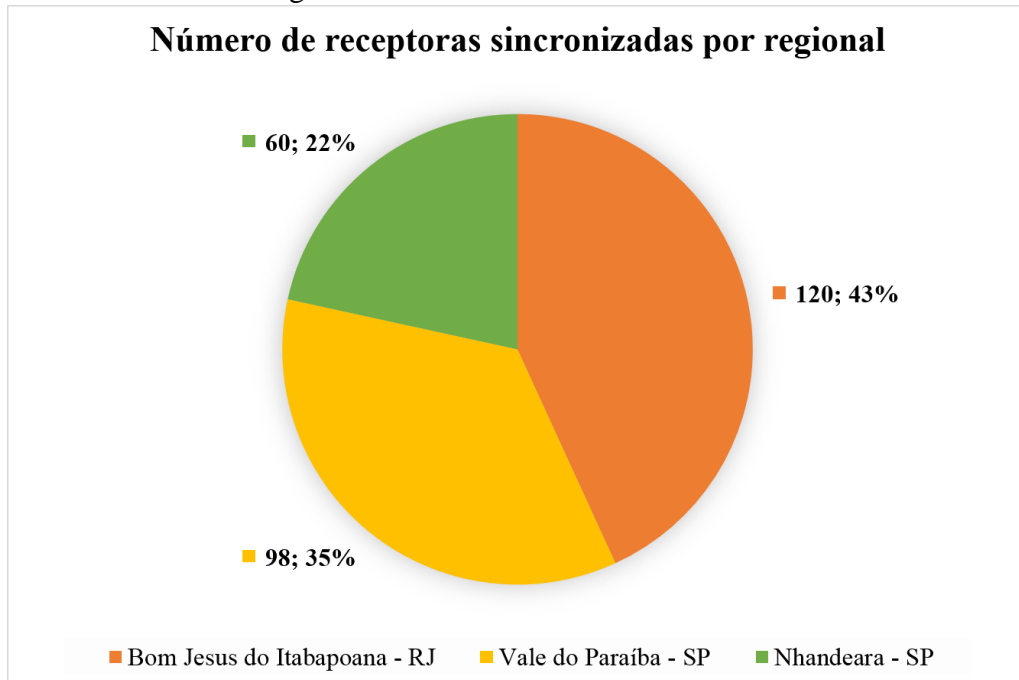
As sincronizações acompanhadas durante o período de estágio foram realizadas durante o desenvolvimento do projeto Vigor Genética, que consiste em um programa de transferência de embriões por valores mais acessíveis para os proprietários, visando o melhoramento genético dos rebanhos leiteiros que fornecem matéria prima para o laticínio.

Durante a realização dos trabalhos, a estagiária acompanhava o Médico Veterinário nas viagens e auxiliava na organização do material necessário, na montagem dos implantes no aplicador, na aplicação dos hormônios, no registro de dados, assim como na realização do exame ginecológico por meio da palpação retal e ultrassonografia.

Ao todo, foram sincronizadas 278 fêmeas, distribuídas por 21 propriedades localizadas nos Estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Essas fazendas eram agrupadas por regionais, de acordo com a localização do laticínio em que o leite era beneficiado. O número de receptoras

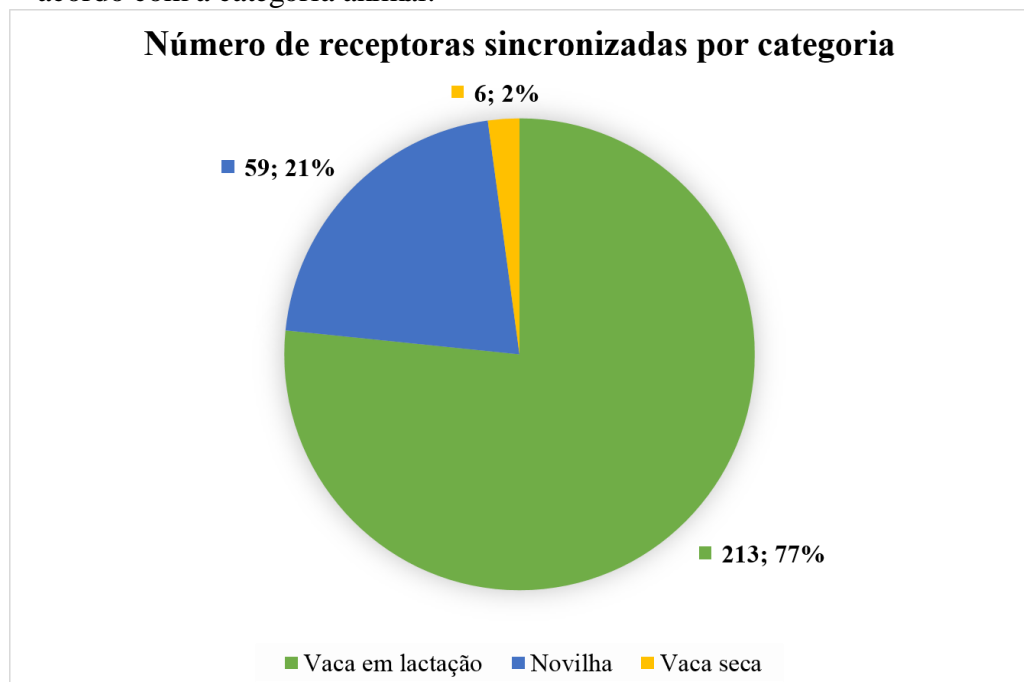
sincronizadas por regional é exposto no Gráfico 4. Já no Gráfico 5, as fêmeas são agrupadas de acordo com a categoria animal e no Gráfico 6, divididas por grupo genético.

Gráfico 4 – Número absoluto e relativo de receptoras que foram sincronizadas para TETF de acordo com a regional.



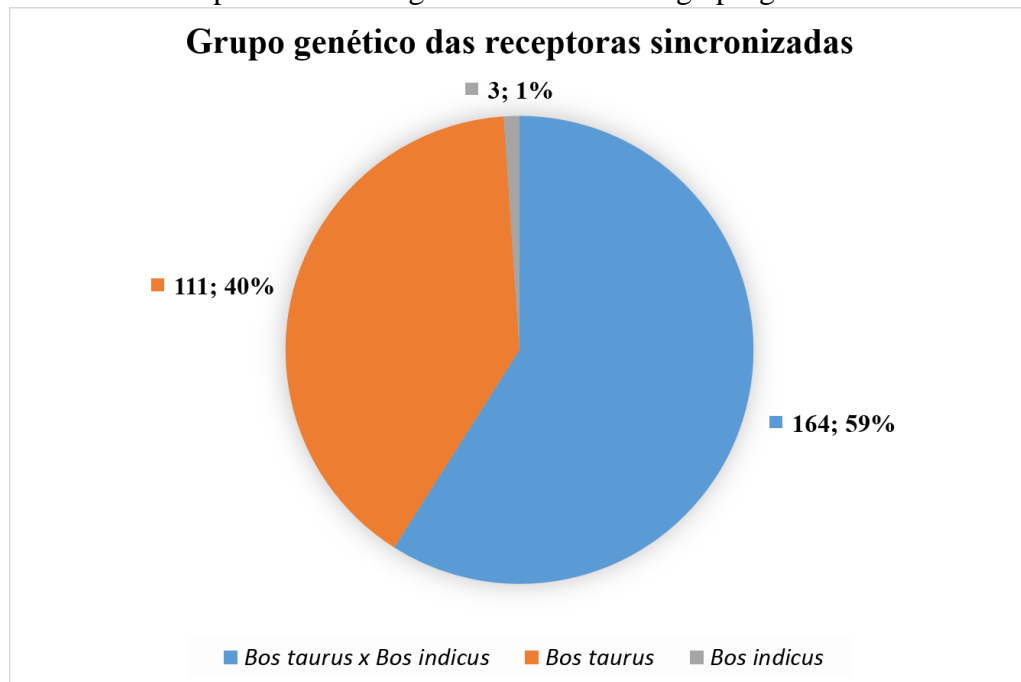
Fonte: Do autor (2021).

Gráfico 5 – Número absoluto e relativo de receptoras que foram sincronizadas para TETF de acordo com a categoria animal.



Fonte: Do autor (2021).

Gráfico 6 – Número absoluto e relativo de receptoras que foram sincronizadas para TETF durante o período de estágio de acordo com o grupo genético.



Durante a realização dos manejos, foram encontradas diferenças significativas entre as propriedades de acordo com a localização. As fazendas do Rio de Janeiro eram menos tecnificadas e na grande maioria, os animais eram cruzados (*Bos taurus x Bos indicus*) e criados à pasto. Já no Estado de São Paulo, havia uma predominância de animais com maior grau de sangue taurino, mantidos em sistemas de confinamento, como *Free Stall* e *Compost Barn*. Acredita-se que o contraste observado seja devido às condições climáticas típicas de cada região, assim como pelo fato do território paulista ter uma pecuária leiteira bem estabelecida e de destaque dentro do cenário nacional (FIGURA 13).

Dentro do projeto Vigor Genética, eram ofertados embriões Girolando em diferentes graus de sangue. Como os animais de origem europeia são sabidamente mais propensos ao estresse por calor e as propriedades da regional de Bom Jesus do Itabapoana - RJ estavam localizadas em uma região de temperaturas mais elevadas, os proprietários optavam por adquirir embriões 1/2 sangue Holandês-Gir, visto que as condições ambientais não são favoráveis para que animais com grau de sangue mais apurado possam manifestar seu potencial genético. Em contrapartida, no Estado de São Paulo, a preferência era por embriões 3/4 ou 7/8 Girolando.

Figura 13 – Fazendas nos Estados do Rio de Janeiro (A) e São Paulo (B), onde foram realizados os protocolos de sincronização da ovulação.



Fonte: Do autor (2021).

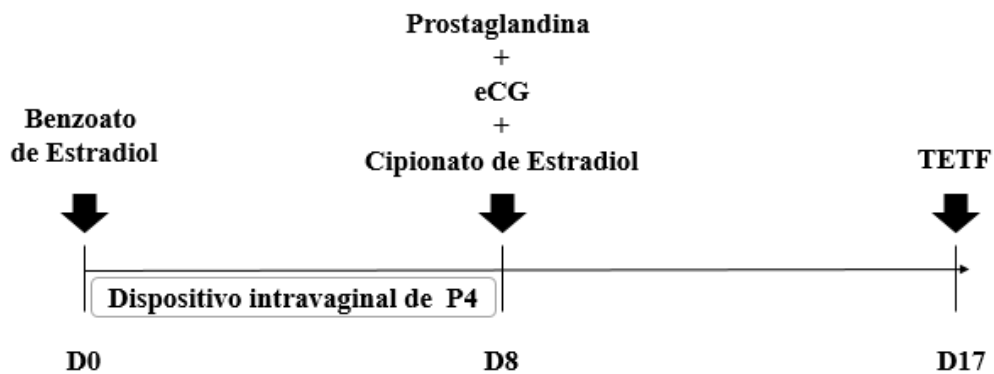
Previamente ao início da administração dos hormônios, era realizado exame ginecológico por palpação retal e avaliação ultrassonográfica, a fim de avaliar a atividade ovariana e a condição uterina, sendo que 201 receptoras (72%) estavam cíclicas ao início do protocolo. Animais em anestro, com distúrbios no útero e/ou conformação anatômica comprometida que impossibilitasse a ovulação, eram excluídos do protocolo. É primordial que as receptoras apresentem boas condições sanitárias, reprodutivas e nutricionais, o que minimiza intercorrências que comprometem os resultados obtidos na TETF, como morte embrionária, abortos e distocias (OLIVEIRA; SARAPIÃO; QUINTÃO, 2014).

Também era feita uma avaliação da condição nutricional por meio da determinação do escore de condição corporal (ECC 1 = caquético e 5 = obeso), sendo o ideal próximo a 3 (= intermediário ou mediano) (MACHADO et al., 2008). Entre as receptoras protocoladas, o ECC variou entre 2,0 e 4,0. O déficit nutricional provoca um decréscimo na liberação de GnRH e por consequência, a liberação de gonadotrofinas hipofisárias também é prejudicada, comprometendo o desenvolvimento folicular (BARUSELLI; GIMENES; SALES, 2007). Independente do protocolo empregado, um bom ECC é fundamental para que a resposta ao tratamento hormonal seja satisfatória (FERREIRA, 2010).

Posteriormente, os animais considerados aptos eram submetidos ao protocolo de sincronização para TETF. No início (D0), era realizada a aplicação intramuscular (IM) de 2 mg

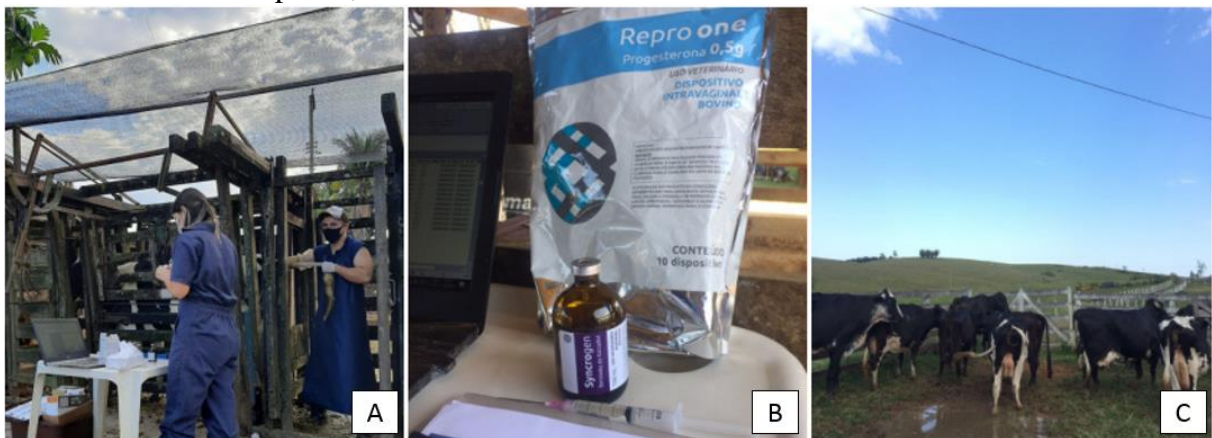
de Benzoato de Estradiol (BE) e inserção de dispositivo intravaginal de Progesterona (P4). Oito dias após (D8), os funcionários das propriedades realizavam a retirada do implante de P4 e a administração IM de 0,5 mg de Cloprostenol Sódico (Prostaglandina sintética análoga à $PGF2\alpha$), 1 mg de Cipionato de Estradiol (CE) e 300 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG). O estro sincronizado era estimado para o dia 10 (D10) e a TETF era realizada após sete dias (D17) (FIGURAS 14 e 15).

Figura 14 – Protocolo de sincronização da ovulação utilizado.



Fonte: Do autor (2021).

Figura 15 – Manejo de sincronização (D0) realizado em propriedades na região de Bom Jesus de Itabapoana, Rio de Janeiro.



Legenda: A – equipe de trabalho; B – hormônios utilizados; C – animais sincronizados.

Fonte: Do autor (2021).

Os protocolos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação se apoiam em três princípios: sincronização do crescimento folicular, controle das concentrações plasmáticas de P4 e por último, ao final do tratamento, sincronização da ovulação (SALES et al., 2012).

A associação entre E2 e P4 no início da sincronização inibe a liberação de FSH e LH, resultando na atresia dos folículos em crescimento, que são dependentes de gonadotrofinas.

Posteriormente, há um aumento nas concentrações de FSH devido a metabolização do E2, provocando a emergência de uma nova onda de crescimento folicular, o que ocorre em aproximadamente três dias (MADUREIRA et al., 2020).

O dispositivo intravaginal utilizado difere conforme categoria e/ou raça das receptoras. Vacas *Bos taurus* em lactação de alta produção, recebem implante monodose contendo 1 g de P4. Já em novilhas, fêmeas zebus ou azebuadas, era utilizado implante monodose 0,5 g de P4 ou multiuso previamente utilizado. Devido a metabolização mais lenta dos *Bos indicus*, os níveis plasmáticos de P4 tendem a ser mais elevados durante a permanência do implante, acarretando na redução exacerbada do pulso de LH, o que pode afetar o desenvolvimento folicular e posteriormente, a ovulação (BARUSELLI; GIMENES; SALES, 2007).

O tempo de permanência do implante de P4 relatado varia entre cinco e nove dias, no entanto, há poucas evidências que justifiquem o período ideal (MADUREIRA et al., 2020). Alterações nesse período entre seis e nove dias testadas por diversos autores e descritas por Baruselli e colaboradores (2017), se mostraram equivalentes e não resultaram em diferenças significativas na concepção pós IATF.

Próximo ao término do tratamento hormonal, é esperado que haja um folículo em estágio de dominância, sendo necessário minimizar as concentrações de P4, tanto de origem endógena (proveniente do corpo lúteo – CL), como exógena (proveniente do implante de P4), para que o crescimento final do folículo e a ovulação ocorram (MADUREIRA et al., 2020; PRATA et al., 2020). Dessa forma, simultaneamente a retirada do dispositivo de P4, é feita a administração de PGF2 α , visando a luteólise, e de um indutor da ovulação (BÓ et al., 2016).

O efeito luteolítico da PGF2 α depende da presença de receptores, que são encontrados em quantidade inferior no CL jovem, sendo o tratamento pouco efetivo nos primeiros cinco dias pós ovulação. Comercialmente, existem duas prostaglandinas sintéticas semelhantes à PGF2 α , o Dinoprost Trometamina e Cloprostenol Sódico, sendo o último mais potente e de maior meia vida (D'ÁVILA et al., 2019).

Objetivando a indução da ovulação, além do CE empregado no protocolo, diferentes fármacos podem ser utilizados. Como exemplo, os análogos de GnRH, outros Ésteres de Estradiol (p. ex. Benzoato), LH e Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG). No entanto, o tempo entre a administração e a ovulação difere de acordo com o hormônio utilizado e dessa forma, o momento da aplicação deve ser ajustado (ALVES et al., 2021; D'ÁVILA et al., 2019).

A ovulação induzida à base de E2 e GnRH são os métodos mais utilizados. Em concentrações reduzidas de P4, o mecanismo de ação dos Ésteres de Estradiol consiste em estimular a maior liberação de GnRH pelo hipotálamo, que por sua vez, estimula a hipófise a

liberar um pico de LH pré-ovulatório, resultando na indução da ovulação. Já com o uso de GnRH, o estímulo é diretamente na hipófise (D'ÁVILA et al., 2019; MADUREIRA et al., 2020).

Tanto o BE quanto o CE se mostraram eficazes na indução da ovulação, entretanto, a farmacocinética difere entre os fármacos. O CE apresenta uma meia vida mais longa e menor biodisponibilidade em comparação ao BE e conseqüentemente, o pico de LH induzido pelo BE é mais rápido, cerca de trinta horas antes (50,5 vs 19,6 horas, respectivamente) (SALES et al., 2012).

Ainda concomitante a remoção do dispositivo de P4, a Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) pode ser empregada para induzir um maior crescimento e ovulação do folículo dominante. O mecanismo de ação da eCG consiste na estimulação de receptores gonadotróficos (FSH e LH). Além disso, estudos alegam um incremento na produção de P4 pelo CL após a administração do fármaco, o que está positivamente associado ao desenvolvimento do embrião e a manutenção da prenhez, resultando em maiores taxas de concepção (BARUSELLI; GIMENES; SALES, 2007).

Além de resultar em um folículo dominante de maior tamanho e em um CL de maior diâmetro no diestro subsequente, acredita-se que a maior produção de P4 ocorra também devido ao efeito direto da eCG sob as células luteais, uma vez que constatou-se que vacas tratadas expressavam maior quantidade de proteína (StAR) e enzimas (P450scc e 3β -HSD), que estão relacionadas à síntese de hormônios esteroides (BARUSELLI et al., 2012).

Diante do exposto, evidencia-se a importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização da ovulação em receptoras de embriões, como uma estratégia utilizada objetivando uma maior taxa de ovulação e conseqüentemente, maior taxa de aproveitamento, assim como maiores concentrações séricas de P4 e taxas de concepção (BARUSELLI et al., 2008).

Como o D8 não era realizado pela equipe da CPEX, apesar das orientações feitas aos proprietários e funcionários, houve relatos de situações onde a administração dos hormônios foi realizada de maneira errada, o que prejudicou a resposta ao tratamento hormonal. Outras intercorrências, como o acesso de touros ao lote de receptoras sincronizadas próximo ao dia estimado do estro também foram comunicadas e nesses casos, devido a possibilidade da ocorrência de prenhez por monta natural, a transferência não era realizada.

Apesar das ocorrências citadas, de modo geral, as taxas de aproveitamento (receptoras tratadas/inovuladas) alcançadas eram satisfatórias, em torno de 80%, o que é semelhante aos resultados obtidos por meio de protocolos de sincronização baseados na associação entre E2 e

P4 (BÓ et al., 2002). Cabe ressaltar que a eficiência reprodutiva das receptoras é fundamental para que o emprego da biotecnologia seja economicamente viável, visto que tanto a aquisição como a manutenção desses animais é dispendiosa (REIS, 2004).

3.4 Transferência de embriões

A biotecnologia de transferência de embriões (TE) consiste em transferir um embrião proveniente de uma doadora, produzido *in vivo* ou *in vitro*, para uma fêmea bovina denominada receptora, que levará a gestação a termo (PESSOA; PEREIRA; MELO, 2014). A utilização de protocolos que visam a sincronização da ovulação, permite que a TE seja realizada em tempo fixo (TETF), dispensando a observação do estro (BARUSELLI et al., 2010).

Para o programa de TETF, foram sincronizadas 415 fêmeas e destas, 326 responderam ao tratamento hormonal, resultando em uma taxa de aproveitamento de 78,5%. Entre as receptoras submetidas a transferência, 28% eram novilhas precoces cruzadas (1/2 Nelore x 1/2 Angus) e 72% múltíparas em lactação da raça Nelore (FIGURA 16).

Figura 16 – Fêmeas Nelore e cruzadas (1/2 Nelore x 1/2 Angus) utilizadas como receptoras durante programa de TETF, em propriedade localizada no município de Bataguassu, Mato Grosso do Sul.

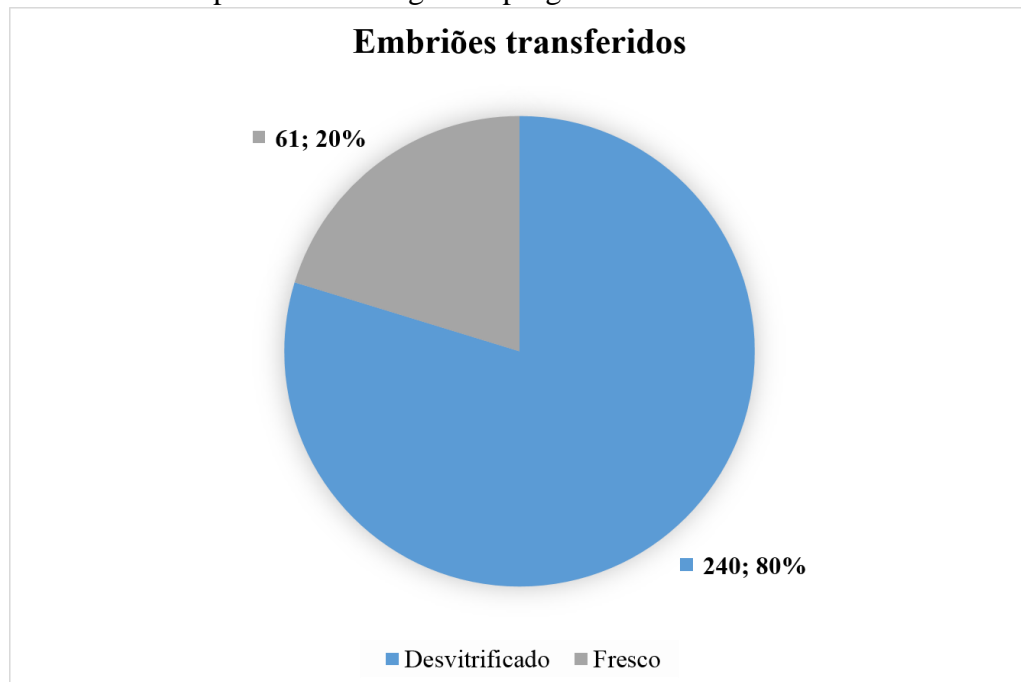


Fonte: Do autor (2021).

Todas as transferências foram realizadas em uma única propriedade, localizada em Bataguassu, Mato Grosso do Sul, durante três dias de trabalho. Os embriões foram inovulados

no sétimo dia de desenvolvimento, à fresco ou criopreservados pelo processo de vitrificação, como mostra o Gráfico 7.

Gráfico 7 – Número absoluto e relativo de embriões à fresco e desvitrificados inovulados durante o período de estágio em programa de TETF.



Fonte: Do autor (2021).

O protocolo de sincronização da ovulação foi previamente realizado, como descrito anteriormente, pela própria equipe da fazenda. A resposta ao tratamento era avaliada no momento da transferência, por meio da palpação retal e/ou ultrassonografia, sendo inovuladas somente as receptoras que apresentavam CL em algum dos ovários.

Também era realizada uma classificação subjetiva do CL, de acordo com a proeminência no ovário (detectada durante a palpação) e tamanho (visto pelo ultrassom), sendo que: CL1 – pequena proeminência/tamanho; CL2 – proeminência/tamanho intermediário e CL3 – grande proeminência/tamanho. No entanto, a classificação não interferia na realização ou não da transferência.

Estudos com novilhas (*Bos taurus x Bos indicus*), concluíram que as receptoras que ficaram gestantes após a TE, apresentaram um diâmetro maior do CL e maiores concentrações plasmáticas de P4 seis dias após o estro, caracterizando uma correlação positiva entre as duas variáveis citadas e taxa de concepção (BARUSELLI et al., 2003). Resultados semelhantes foram obtidos por Alkan e colaboradores (2020), que também demonstraram correlação positiva entre o tamanho do CL e o diagnóstico de prenhez positivo aos 30 dias.

Em contrapartida, há descrição de outros estudos onde não foi observado incremento na concepção e na concentração sérica de P4 com o aumento do diâmetro do CL (BARUSELLI et al., 2003). Assim como em experimento realizado por Nogueira M. et al. (2004), onde receptoras com concentrações mais elevadas de P4 e maior diâmetro de CL apresentaram taxa de prenhez inferior.

A produção adequada de P4 é fundamental, visto que induz a secreção das glândulas endometriais, atua no desenvolvimento do concepto, assim como no reconhecimento e prosseguimento da gestação (MARTINS et al., 2014). Acredita-se que a concentração plasmática de P4 influencie diretamente no reconhecimento materno da gestação, uma vez que maiores concentrações estão relacionadas a uma maior secreção de interferon-tau (IFN- τ) pelo embrião, o que bloqueia a síntese de PGF2 α pelo endométrio e, conseqüentemente, evita a luteólise (BINELLI et al., 2001).

Além da presença do CL, é imprescindível que haja sincronia entre a idade do embrião e o ambiente uterino da receptora. Como os embriões eram transferidos no sétimo dia de desenvolvimento, o ideal é que as fêmeas tenham manifestado cio 7 dias antes da inovulação. Andrade et al. (2012) constataram efeito dessa sincronia na taxa de concepção, uma vez que receptoras que deram cio no dia da FIV (sincronia = 0) apresentaram aumento significativo no número de gestações quando comparado às que manifestaram cio um dia antes ou depois da FIV (sincronia = +1 e -1, respectivamente).

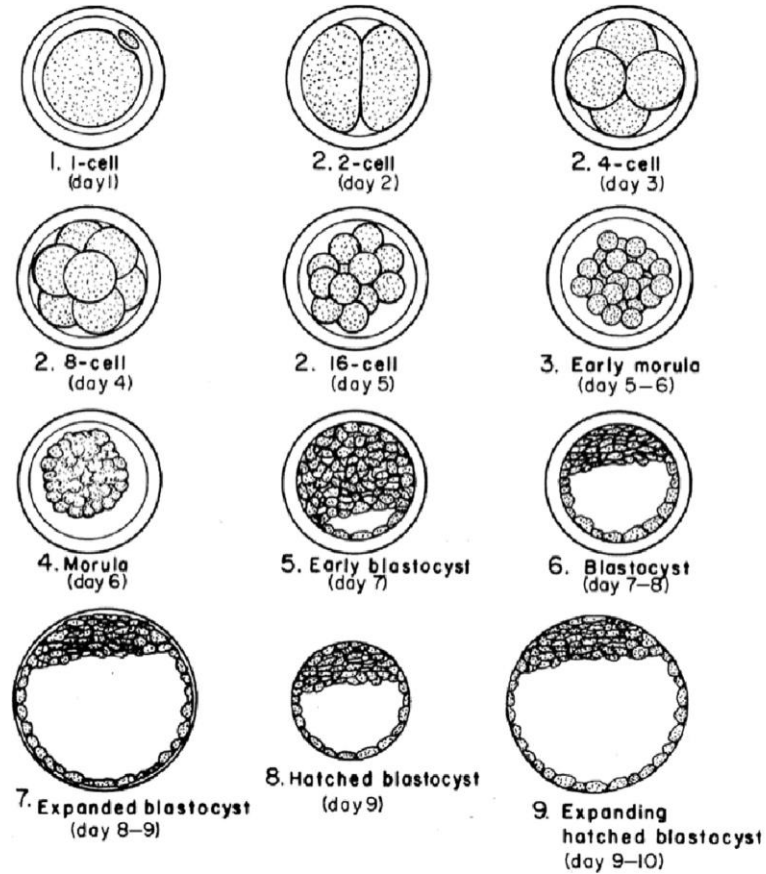
Precedente à TETF, o reaquecimento dos embriões vitrificados e o envase dos blastocistos eram realizados pela técnica do laboratório, de acordo com os protocolos estabelecidos e acompanhados pela estagiária. O envase era realizado em palhetas de 0,25 ml, que posteriormente eram vedadas por um lacrador numerado e acondicionadas em transportadoras de embriões aquecidas a 36°C.

Previamente ao envase, era realizada uma avaliação quanto ao grau de desenvolvimento e qualidade dos embriões, sendo envasados os classificados como blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX) e blastocisto eclodindo (BN) com grau de qualidade 1, no caso dos embriões desvitrificados. Além dos citados, estruturas a fresco de qualidade 2 ou fase de mórula (MO) e blastocisto eclodido (BE) também eram envasadas. Preferencialmente, eram selecionados os BX, visto que observações de campo indicam uma maior taxa de concepção.

A avaliação permite inferir se o estágio de desenvolvimento é condizente com a idade do embrião (FIGURA 17), o que está relacionado com a viabilidade e qualidade do mesmo. A Sociedade Internacional de Embriões (IETS) propõe uma classificação expressa em dois

números, baseada no grau de desenvolvimento e qualidade (TABELA 3), sendo que os classificados em qualidade 1 e 2, estão relacionados a maiores taxas de prenhez (PHILIPPS; JAHNKE, 2016).

Figura 17 – Desenvolvimento embrionário normal em bovinos.



Fonte: Stringfellow; Seidel (1998).

Quadro 3 – Classificação dos embriões proposta pela IETS por código de dois dígitos, de acordo com o estágio de desenvolvimento e qualidade embrionária.

| Código | Estágio de desenvolvimento | Código | Grau de qualidade |
|--------|--------------------------------|--------|---------------------|
| 1 | Não fertilizado | 1 | Excelente ou bom |
| 2 | 2 – 12 células | 2 | Razoável |
| 3 | Mórula inicial | 3 | Ruim |
| 4 | Mórula | 4 | Morto ou degenerado |
| 5 | Blastocisto inicial | - | - |
| 6 | Blastocisto | - | - |
| 7 | Blastocisto expandido | - | - |
| 8 | Blastocisto eclodido | - | - |
| 9 | Blastocisto eclodido expandido | - | - |

Fonte: adaptado de Stringfellow; Seidel (1998).

As informações quanto ao número do lacrador, identificação da doadora e do touro e grau de desenvolvimento do embrião eram registradas em uma ficha de transferência. O formulário também tinha um campo para posterior anotação do número de identificação da receptora e era entregue ao Médico Veterinário responsável por realizar as inovulações, juntamente com a transportadora contendo os embriões.

No momento da transferência, retirava-se o lacre e a palheta era encaixada em uma bainha estéril revestida por uma camisinha sanitária para TE e acoplada a um inovulador. A técnica utilizada era a inovulação transcervical, na qual o inovulador é inserido via vaginal e guiado por palpação retal, de modo a adentrar a cérvix e atingir o corno uterino ipsilateral ao ovário com a presença do CL, onde a deposição do embrião era realizada o mais cranialmente possível (FIGURA 18).

Figura 18 – TETF realizada em propriedade localizada no município de Bataguassu, Mato Grosso do Sul.



Fonte: Do autor (2021).

A estagiária auxiliava o transferidor na organização e higienização dos equipamentos, na montagem do inovulador, na realização de anotações dos dados necessários e na avaliação das receptoras para verificar a resposta ao protocolo de sincronização, momento em que era possível praticar e aperfeiçoar os conhecimentos práticos relacionados à palpação retal e exame ultrassonográfico.

Em relação a técnica utilizada para a transferência, o recomendado é que a deposição do embrião seja feita no corno ipsilateral ao ovário onde ocorreu a ovulação, uma vez que há descrição indicando uma maior taxa de prenhez em transferências realizadas no corno ipsilateral em relação ao contralateral (LOONEY et al., 2006).

Acredita-se que há uma maior vascularização do corno uterino adjacente ao CL em comparação ao corno do lado oposto. Estudos demonstraram uma diferença significativa nas concentrações de P4 entre os vasos dos cornos ipsilateral, contralateral e a veia jugular, onde a concentração foi maior no primeiro, apoiando a hipótese de que ocorre uma maior distribuição de P4 no corno adjacente ao CL (PIERONI, 2009).

Em relação a profundidade, foi observada taxa de prenhez superior quando os embriões foram depositados na região cranial do corno uterino adjacente ao CL quando comparado ao terço médio (ALKAN et al., 2020). No entanto, Pieroni (2009) não observou diferenças morfológicas significativas entre as três porções (cranial, média e caudal) do corno uterino ipsilateral que justifiquem a inovulação em um ponto específico, alegando que a TE realizada em qualquer porção do corno em questão não afeta a concepção.

3.5 Diagnóstico de gestação

O exame gestacional por via retal era realizado 23 dias após a TE (D30), pelo Médico Veterinário e auxiliado pela estagiária, com a utilização de um aparelho ultrassonográfico (DP2200 VET, Mindray), com transdutor linear multifrequencial (5,0 – 8,0 MHz). Posteriormente, aos 53 dias após a TE (D60), era realizado o diagnóstico confirmatório, estabelecendo a porcentagem de perdas gestacionais, assim como a sexagem fetal.

Durante o período do estágio, 133 receptoras foram submetidas ao diagnóstico de gestação (DG), distribuídas por 07 propriedades, que integravam o projeto Vigor Genética, citado anteriormente, e localizadas na regional de Nhandeara-SP. Todas as fêmeas foram inovuladas com embriões à fresco (FIGURA 19).

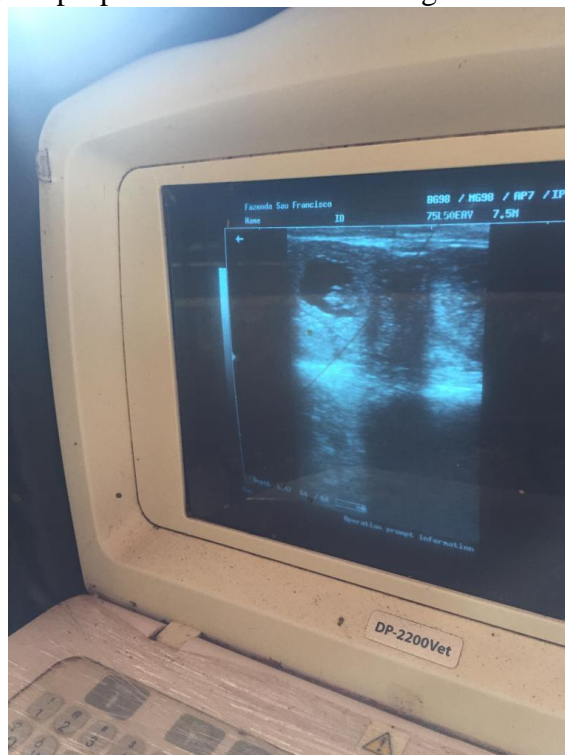
O exame consistia na avaliação uterina e ovariana, sendo o diagnóstico positivo caracterizado pela visualização da vesícula embrionária e identificação do batimento cardíaco, atestando a viabilidade do conceito, associado a presença de CL em um dos ovários (FIGURA 20). A taxa geral de concepção (número de receptoras gestantes/número de receptoras transferidas) é apresentada no Gráfico 8.

Figura 19 – Receptoras submetidas ao diagnóstico de gestação (D30), em propriedade localizada na regional de Nhandeara, São Paulo.



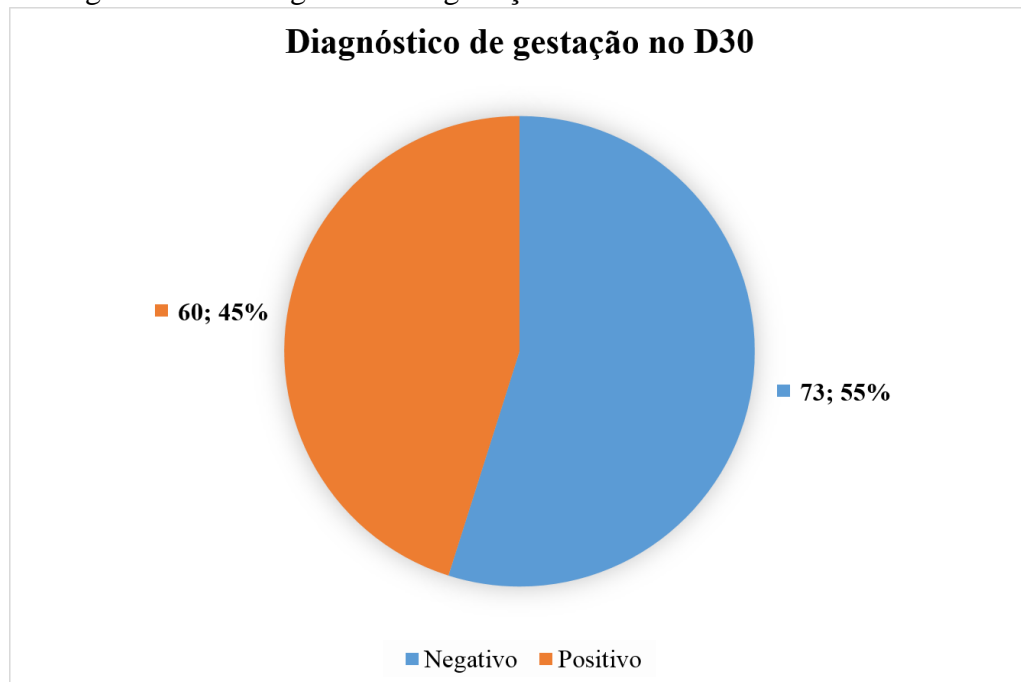
Fonte: Do autor (2021).

Figura 20 – Imagem ultrassonográfica obtida durante diagnóstico de gestação positivo (D30), com presença do embrião (hiperecogênico) circundado por líquido amniótico (anecóico), em propriedade localizada na região de Nhandeara, São Paulo.



Fonte: Do autor (2021).

Gráfico 8 – Número absoluto e relativo de receptoras diagnosticadas como gestantes e não gestantes no diagnóstico de gestação realizado aos 30 dias.

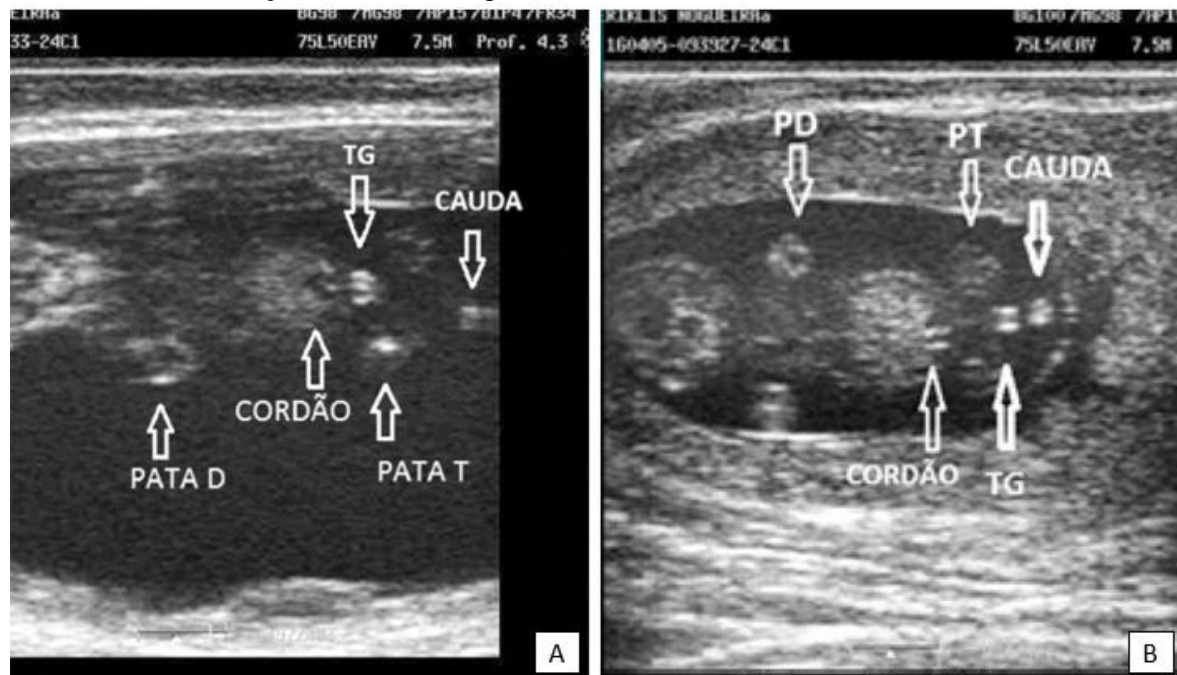


Fonte: Do autor (2021).

A utilização do ultrassom permite a determinação da prenhez em estágio precoce, sendo possível a identificação do embrião, assim como do batimento cardíaco, aproximadamente aos 20 dias de gestação. No entanto, exames realizados antes de 25 dias são menos precisos e dependem de maior tempo e manipulação (NOGUEIRA et al., 2021). Desta forma, visando maior precisão e confiabilidade, o ideal é que o DG seja realizado mais próximo aos 30 dias de gestação (FRICKE et al., 2016).

A sexagem fetal precoce através da ultrassonografia consiste na identificação e localização do tubérculo genital (TG), entre 55 e 75 dias de gestação. Próximo aos 50 dias, o TG até então localizado na linha média, entre os membros pélvicos, sofre uma migração que se distingue de acordo com o sexo. Nas fêmeas, assume uma posição ventral em relação a base da cauda e posteriormente, dará origem ao clitóris. Já nos machos, é localizado caudalmente ao cordão umbilical e se diferencia formando a glândula do pênis. Ao ultrassom, o TG possui aspecto bilobular e hiperecoico (FERREIRA, 2010; NOGUEIRA et al., 2021) (FIGURA 21).

Figura 21 – Imagens ultrassonográficas de sexagem fetal precoce a partir da identificação e localização do tubérculo genital. A – macho; B – fêmea.



Legenda: TG – tubérculo genital; pata D/PD – pata dianteira; pata T/PT – pata traseira; cordão – cordão umbilical.

Fonte: Nogueira et al. (2021).

As taxas de concepção resultantes da transferência de embriões PIV são amplamente variáveis, sendo descritos índices entre 20 e 60% aos 60 dias de gestação (VARAGO; MENDONÇA; LAGARES, 2008). As taxas próximas de 40% são consideradas como aceitáveis (GRÁZIA; DOS SANTOS, 2021).

Sartori et al. (2016) relataram taxas de concepção de 35,4%, 38,2%, 45,1% e 46,5% aos 30 dias, resultantes de inovulações de embriões frescos das raças Jersey, Holandês, Girolando (5/8 Holandês x 3/8 Gir) e Gir, respectivamente. Já em transferências utilizando embriões de raças de corte a fresco, os resultados reportados foram de 43,3% e 44,4% para Senepol e Nelore no D30, respectivamente.

Já as perdas gestacionais (entre 30 e 60 dias), variaram entre 4,4% e 13,3% e de 9,1% a 12,3% em gestações provenientes da transferência de embriões a fresco das raças leiteiras e de corte citadas, respectivamente, e são consideradas como aceitáveis (SARTORI et al., 2016).

Em relação aos embriões criopreservados, há relatos de taxas de concepção inferiores em comparação a utilização de embriões a fresco. Em experimento de Sanches et al. (2016), houve diferença significativa entre os resultados obtidos no DG aos 30 dias com o uso de embriões a fresco ($51,35\% \pm 1,87\%$), quando comparado a embriões vitrificados ($35,89\% \pm 3,87\%$) e aos submetidos ao congelamento lento (*Direct Transfer – DT*) ($40,19\% \pm 4,65\%$).

A criopreservação permite certa flexibilidade e maior eficiência aos programas de TE, por propiciar a inovulação dos embriões em momento oportuno. Dentre as técnicas utilizadas, a vitrificação é a mais empregada, visto que é rápida e de menor custo. Contudo, é necessária mão de obra especializada para o reaquecimento e avaliação dos blastocistos previamente a transferência (FILHO, 2018).

Em contrapartida, apesar de menos econômica, a tecnologia de congelamento lento dispensa a necessidade de um técnico de laboratório no momento da transferência, facilitando o emprego em larga escala, com taxas de concepção semelhantes às obtidas com o uso de embriões criopreservados pelo método de vitrificação (SANCHES et al., 2016).

As taxas de concepção inferiores alcançadas na utilização de embriões criopreservados, são justificadas por possíveis injúrias celulares causadas pelo processo de criopreservação, que afetam o desenvolvimento embrionário. Estudos demonstraram que a secreção de IFN- τ , fator imprescindível para o reconhecimento materno da gestação, é inferior em embriões criopreservados em comparação aos que não foram submetidos ao processo de congelamento, o que pode acarretar em perda gestacional precoce, devido a secreção em quantidades reduzidas (ARAÚJO et al., 2005).

Cabe ressaltar que os resultados reprodutivos obtidos pelo emprego da TE são sujeitos a variações e dependentes de diversos fatores, dentre eles, a qualidade dos embriões, tamanho do CL e concentração plasmática de P4, a sincronia entre idade do embrião e o ambiente uterino da receptora, assim como as condições nutricionais, sanitárias e reprodutivas dessas fêmeas (FILHO, 2018).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em uma visão mundial, o Brasil assume uma posição de destaque, não só na produção e transferência de embriões, mas também em pesquisas científicas relacionadas a reprodução animal, o que contribui para o desenvolvimento e implementação crescente das biotécnicas reprodutivas.

A realização do estágio supervisionado possibilitou a vivência prática dos processos relacionados a produção *in vitro* de embriões. Além do desenvolvimento profissional, foi possível estreitar relações pessoais, conhecer diferentes realidades inerentes à pecuária nacional, assim como expandir a rede de contatos e trocar informações e conhecimentos relevantes dentro da área.

A elaboração deste relatório possibilitou a ampliação dos conhecimentos teóricos, associando-os aos aprendizados práticos, assim como o desenvolvimento da pesquisa e escrita científica, o que foi fundamental para o maior aperfeiçoamento no que tange a reprodução de bovinos e a consolidação da formação acadêmica.

REFERÊNCIAS

- ALKAN, H. et al. Evaluation of the factors that affect the pregnancy rates during embryo transfer in beef heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 4, p. 421-428, 2020.
- ALVES, R. L. O. R. et al. Hormonal combinations aiming to improve reproductive outcomes of *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed AI protocols. **Theriogenology**, v. 169, p. 89-99, 2021.
- ANDRADE, G. A. et al. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 1, p. 66-69, 2012.
- ARAÚJO, M. C. C. et al. Secreção de interferon-tau em embriões bovinos produzidos *in vitro* frescos e congelados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p. 752-756, 2005.
- BARUSELLI, P. S. et al. Bovine embryo transfer recipiente synchronisation and management in tropical environments. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 67-74, 2010.
- BARUSELLI, P. S. et al. Dinâmica folicular e taxa de prenhez em novilhas receptoras de embrião (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com protocolo *Ovsynch* para inovulação em tempo fixo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 96-106, 2003.
- BARUSELLI, P. S. et al. Factors that interfere with oocyte quality for *in vitro* production of cattle embryos: effects of diferente developmental & reproductive stages. **Animal Reproduction (AR)**, v. 13, n. 3, p. 264-272, 2016.
- BARUSELLI, P. S. et al. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. *In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA*, 3., 2008, Londrina, PR. **Anais [...]**. Londrina, 2008. p. 146-167.
- BARUSELLI, P. S. et al. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 134-141, 2012.
- BARUSELLI, P. S. et al. Timed artificial insemination: current challenges and recente advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction (AR)**, v. 14, n. 3, p. 558-571, 2017. *In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Embriões (SBTE)*, 17 a 19 de Agosto de 2017, [Cabo de Santo Agostinho, PE].
- BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 205-211, 2007.
- BATISTA, E. O. S. et al. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 3, p. 448-452, 2014.

- BINELLI, M. et al. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1451-1463, 2001.
- BÓ, G. A. et al. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 388-396, 2016.
- BÓ, G. A. et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 53-72, 2002.
- D'ÁVILA, C. A. et al. Hormônios utilizados na indução da ovulação em bovinos: artigo de revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 4, p. 797-802, 2019.
- FERREIRA, Ademir de Moraes. **Reprodução da fêmea bovina: fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos)**. 1. ed. Juiz de Fora, Minas Gerais: edição do autor, 2010.
- FILHO, Guilherme Nogueira Borges. **Taxa de concepção e gestação de embriões produzidos *in vitro*, transferidos a fresco ou criopreservado, em vacas e novilhas Nelore**. 2018. Tese (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2018.
- FRICKE, P. M. et al. Methods for and implementation of pregnancy diagnosis in dairy cows. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 32, n. 1, p. 165-180, 2016.
- GIMENES, L. U. et al. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pick-up does not significantly affect *in vitro* embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis*. **Theriogenology**, v. 83, n. 3, p. 385-393, 2015.
- GRÁZIA, J. G. V.; DOS SANTOS, G. M. Avaliação do estágio de desenvolvimento embrionário na taxa de prenhez em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 3, p. 4776-4782, 2021.
- GRÁZIA, João Gabriel Viana de. **Produção *in vitro* de embriões (PIVE) na bovinocultura de leite e de corte**. 2019. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.
- GUERREIRO, B. M. et al. Prepubertal Holstein heifers have low efficiency when submitted to ovum pick-up and *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction (AR)**, v. 11, n. 3, p. 405, 2014. *In*: 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), 14 a 17 de Agosto de 2014, [Natal, RN].
- LOONEY, C. R. et al. Improving fertility in beef cow recipients. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 201-209, 2006.
- MACHADO, R. et al. **Escore da condição corporal e sua aplicação no manejo reprodutivo de ruminantes**. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, Dezembro 2008.
- MADUREIRA, G. et al. Progesterone-based timed AI protocols for *Bos indicus* cattle I: evaluation of ovarian function. **Theriogenology**, v. 145, p. 126-137, 2020.

MARTINS, T. et al. Effect of progesterone concentrations, follicle diameter, timing of artificial insemination, and ovulatory stimulus on pregnancy rate to synchronized artificial insemination in postpubertal Nelore heifers. **Theriogenology**, v. 81, n. 3, p. 446-453, 2014.

NOGUEIRA, E. et al. Effect of breed and corpus luteum on pregnancy rate of bovine embryo recipients. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 9, p. 2129-2133, 2012.

NOGUEIRA, E. et al. Utilização da ultrassonografia na reprodução de fêmeas bovinas. *In*: NOGUEIRA, E. et al. **Ultrassonografia na reprodução e avaliação de carcaças em bovinos**. Brasília, DF: Embrapa, 2021. *E-book*.

NOGUEIRA, M. F. G. et al. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF 2α and eCG? **Theriogenology**, v. 61, p. 1283-1290, 2004.

OLIVEIRA, C. S.; SARAPIÃO, R. V.; QUINTÃO, C. C. R. **Biotécnicas da reprodução em bovinos**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 2014.

PESSOA, A. B. C. M.; PEREIRA, E. T. N.; MELO, M. I. V. Influência do local de inovulação e do tamanho de corpo lúteo sobre a taxa de prenhez em programa de transferência de embriões bovinos em tempo fixo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 4, p. 237-241, 2014.

PHILLIPS, P. E.; JAHNKE, M. M. Embryo transfer (techniques, donors, and recipients). **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 32, n. 2, p. 365-385, 2016.

PIERONI, Juliana de Souza Pinto. **Influência do local de inovulação de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* sobre as taxas de concepção de fêmeas bovinas e sua relação com a morfologia uterina**. 2009. Tese (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

PONTES, J. H. F. et al. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1349-1355, 2010.

PONTES, J. H. F. et al. 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, n. 9, p. 1640-1646, 2011.

PRATA, A. B. et al. Progesterone-based timed AI protocols for *Bos indicus* cattle III: comparison of protocol lengths. **Theriogenology**, v. 152, p. 29-35, 2020.

REIS, Everton Luiz. **Efeito da dose e do momento da administração de gonadotrofina coriônica equina (eCG) no protocolo de sincronização da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo**. 2004. Tese (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

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

- SALES, J. N. S. et al. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 510-516, 2012.
- SANCHES, B. V. et al. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1147-1151, 2016.
- SARTORI, R. et al. Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. **Animal Reproduction (AR)**, v. 13, n. 3, p. 300-312, 2016.
- SENEDA, M. M. et al. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 1-2, p. 37-43, 2001.
- STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual of the International Embryo Transfer Society**. 3. ed. Champaign, IL: International Embryo Transfer Society, 1998.
- VALVERDE, Alexander; SINCLAIR, Melissa. Técnicas de anestesia local e analgésicas em suínos e ruminantes. *In*: GRIMM, K. A. et al. **Lumb & Jones: anesthesiologia e analgesia em veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Roca, 2017.
- VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.
- VIANA, J. H. M. et al. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 1-2, p. 1-12, 2004.
- VIANA, João Henrique Moreira. Estatísticas do mercado de embriões. **Jornal O Embrião**, ano XXXVI, edição 67, p. 26-31, setembro 2021. *Online*. Disponível em: http://www.sbte.org.br/arquivos/jornal/Ed_67_Oembriao_Site-4.pdf. Acesso em: 20 out. 2021.
- VIEIRA, L. M. et al. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve *in vitro* embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 82, n. 2. P. 318-324, 2014.
- ZANIN, Renato. **Eficiência da produção de embriões *in vitro* através de aspiração folicular transvaginal em bovinos das raças Girolando, Brangus e Nelore**. 2013. Tese (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.