



CAMILA SILVEIRA CAMPOS RESENDE

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA ABS
PECPLAN
UBERABA - MG**

**LAVRAS - MG
2022**

CAMILA SILVEIRA CAMPOS RESENDE

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA ABS PECPLAN
UBERABA - MG**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Zootecnia, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. PhD. José Camisão de Souza
Orientador

**LAVRAS - MG
2022**

CAMILA SILVEIRA CAMPOS RESENDE

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA ABS PECPLAN
UBERABA - MG**

**SUPERVISED INTERNSHIP CARRIED OUT AT ABS PECPLAN
UBERABA - MG**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Zootecnia, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 18 de abril 2022.

PhD. José Camisão de Souza UFLA

MSc. Pâmella Alves Correia UFLA

Luana Thamirys Duarte Furtado UFLA

Prof. PhD. José Camisão de Souza
Orientador

**LAVRAS - MG
2019**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, Eliana e Luciano, por sempre serem minha base para tudo, por serem meu porto seguro e me apoiarem em todos os momentos e em todas as minhas escolhas. Muito obrigada, vocês foram fundamentais para minha formação no curso de zootecnia.

Às minhas irmãs, Tamiris e Stella, por passarem todo o tempo de faculdade compartilhando momentos comigo, me apoiando, me dando forças quando precisei e por serem compreensivas nos meus momentos difíceis.

Aos meus familiares, em especial minha avó Nadir, meu avô Alfreu, meu tio Carlos e minha tia Auxiliadora, pela boa influência e pelo apoio de sempre, vocês tiveram um papel imprescindível na minha formação.

A todos meus amigos que seguiram ao meu lado contribuindo para que essa conquista fosse possível, aos amigos especiais que estiveram dentro e fora da universidade comigo, aqueles também que se afastaram com o tempo, sem vocês essa caminhada seria árdua e mais difícil, muito obrigada.

À minha amiga Luana que foi minha grande companheira nos últimos anos da graduação, estando sempre comigo nos momentos mais difíceis.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização deste curso.

Em especial, ao professor José Camisão de Souza, por ter me passado tanto conhecimento com sua incontável experiência, foi um privilégio e tenho orgulho de ser sua orientada e ter te acompanhado em todos os anos da graduação, minha paixão por reprodução animal começou pela admiração a você.

A todos os professores que transmitiram seus ensinamentos durante esta trajetória.

A minha mentora e amiga Pâmella que fez com que a realização do meu estágio fosse possível, que me ensinou tanto a ser profissional e sempre foi uma referência contribuindo muito para meu crescimento.

Ao Grupo de Estudo em Reprodução – GERE, que foi um grande contribuinte para meu conhecimento profissional, por todos que passaram por ele deixando cada um, um aprendizado diferente e muito válido.

A todos os colaboradores da ABS Pecplan, por cada ensinamento, por me receberem e me acolherem muito bem e pelas amizades especiais conquistadas durante o estágio. Em especial ao meu supervisor Osvaldo, o qual foi ponte e inspiração para meu estágio no laboratório e que me orientou sempre de forma especial, sou muito grata.

A todos os animais que fizeram parte da minha jornada como acadêmica e estagiária, em especial aos meus animais de estimação, deixo aqui registrado o meu agradecimento e compromisso em sempre honrá-los e respeitá-los.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que essa conquista fosse possível, o meu muito obrigado.

Serei eternamente grata a todos!

RESUMO

A bovinocultura é um dos setores da pecuária que mais movimentam a economia do país, fazendo parte direta ou indiretamente na vida das pessoas. A reprodução bovina é um dos grandes contribuintes para o desenvolvimento desse setor, com a aplicação das biotecnologias reprodutivas como Transferência de Embriões em Tempo Fixo (TETF) e Produção *in vitro* de Embriões (PIVE), tendo cada vez mais pesquisas nesse ramo, procurando melhorias na produção animal. Com isso, o objetivo desse trabalho foi apresentar um relatório de estágio realizado na empresa ABS Pecplan, descrevendo as atividades realizadas na área de reprodução animal, com ênfase em TETF e PIVE. Durante o período de estágio foi possível acompanhar os procedimentos realizados pelos médicos veterinários a campo, como, avaliação e sincronização das receptoras, transferência de embriões, diagnóstico gestacional e sexagem fetal. E no laboratório, procedimentos como, Fertilização *In Vitro*, Cultivo *In Vitro*, avaliação do desenvolvimento embrionário, envase à fresco e criopreservação de embriões. Desse modo, o estágio foi essencial para meu crescimento, proporcionando um enorme conhecimento nessa área e também como reagir em ambientes profissionais e situações sobre pressão, sendo imprescindível na minha formação em zootecnia.

Palavras-chave: Reprodução bovina. Produção *In Vitro* de embriões. Transferência de embriões.

FIGURAS

Figura 1– Manejo de aspiração folicular.....	13
Figura 2 - Avaliação do escore de condição corporal das receptoras	14
Figura 3 - Etapas de trabalho e recomendações do protocolo de sincronização	15
Figura 4 - Incubadoras com temperatura controlada e gases estabilizantes.....	16
Figura 5 - Centrífuga para sêmen	17
Figura 6 - Etapas do processo de FIV	18
Figura 7 - Classificação dos estágios embrionários.....	19
Figura 8 - Classificação embrionária	19
Figura 9 - Procedimento de vitrificação de embriões	20
Figura 10 - Mesa montada para transferência de embriões.....	22
Figura 11 - Total de embriões produzidos ABS Pecplan Global	23
Figura 12 - Total de embriões produzidos ABS Pecplan Brasil.....	23
Figura 13 - Total de embriões transferidos, vitrificados e direct transfer na ABS Pecplan Brasil	24
Figura 14 - Classificação dos oócitos	31
Figura 15 - Classificação morfológica dos embriões bovinos produzidos in vivo.....	34
Figura 16 - Classificação de acordo com a qualidade dos embriões produzidos in vivo.	35
Figura 17 - Produção de embriões bovinos no Brasil no período 1996-2018, total e por tecnologia adotada (in vivo ou in vitro).	36
Figura 18 - Produção de embriões bovinos no Brasil em 2018, estratificada por segmento e por tecnologia adotada (in vivo ou in vitro).....	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 DESCRIÇÃO DO LOCAL E PERÍODO DO ESTÁGIO.....	12
2.1 Instalações	12
2.2 Aspiração Folicular	13
2.2.1 Seleção das receptoras.....	13
2.2.2 Método de avaliação das receptoras.....	14
2.2.3 Protocolos de sincronização das receptoras.....	14
2.2.4 Seleção e maturação dos oócitos.....	15
2.2.5 Fecundação <i>in vitro</i> dos oócitos (FIV).....	16
2.2.6 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	17
2.2.7 Clivagem.....	18
2.2.8 Avaliação do desenvolvimento embrionário (previsão).....	18
2.2.9 Envase.....	18
2.2.10 Desvitrificação	20
2.3 Manejo das doadoras.....	21
2.3.1 Transferência de embriões	21
2.3.2 Diagnóstico de gestação e sexagem fetal	22
2.4 Volumes de produção.....	22
2.5 Procedimentos acompanhados durante o estágio.....	24
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	25
3.1 Histórico da Produção <i>in vitro</i> de Embriões.....	25
3.2 Reprodução bovina.....	26
3.2.1 Ciclo estral na fêmea bovina.....	27
3.2.2 Controle endócrino do ciclo estral	28
3.3 Aspiração folicular	29
3.4 Maturação <i>in vivo</i>	30
3.5 Seleção e classificação dos oócitos.....	30
3.6 Fecundação <i>In Vitro</i> (FIV)	31
3.7 Cultivo <i>in vitro</i>	31

3.7.1 Desenvolvimento embrionário em bovinos	32
3.7.2 Avaliação e classificação dos embriões	33
3.8 Métodos de criopreservação	35
3.9 Transferência de Embriões em Tempo Fixo.....	36
4 Avaliação e Sincronização das receptoras.....	37
4.1 Inovulação	38
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

A produção animal é de extrema importância para o sustento da sociedade brasileira e o desenvolvimento da mesma, visto que está em destaque na economia do país. De acordo com a FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) a demanda por alimento cresce absurdamente ao longo dos anos. A importância da pecuária na economia mundial é de extrema relevância, juntamente com a nutrição, sanidade e reprodução animal que dão base para manter a cadeia produtiva (SILVA et al., 2014). Levando em consideração a importância da produção, pesquisadores tem cada vez mais procurado aprimorar as biotecnologias reprodutivas em busca do aumento dos índices de fertilidade, consequentemente da produtividade.

Dentre as biotecnologias reprodutivas mais utilizadas atualmente, estão em destaque a Produção In Vitro de Embriões (PIVE) e a Transferência de Embriões (TE).

No ano de 1949 foi notificado a primeira TE em bovinos, porém, sem sucesso com o nascimento do bezerro. O primeiro produto oriundo de Transferência de Embrião se deu no ano de 1951. Após o sucesso da técnica se viu a grande importância para a evolução genética dos rebanhos mundiais (SEIDEL JUNIOR; SEIDEL, 2005).

Uma das principais vantagens da técnica da TE, é propiciar uma evolução no sistema de produção em um tempo mais curto em relação a outras biotecnologias como a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). A TE possibilita a geração de um número elevado de descendentes de um mesmo acasalamento, otimizando recursos e aumentando lucros perante uma cadeia produtiva (BARUSELLI et al., 2006). Esta técnica proporciona implementação de biotécnicas análogas, como por exemplo, produção de clones e animais transgênicos. Para sua realização é necessária a sincronização de cio e sua rotina é facilitada pela tecnologia de criopreservação que possibilita o comércio internacional de embriões de diferentes raças (JAINUDEEN et al., 2004; BÓ & MAPLETOFT, 2018).

Atualmente a produção *in vitro* de embriões constitui uma evolução na área de reprodução animal. Trazendo a possibilidade de obtenção de oócitos através da aspiração folicular (OPU) guiada por ultrassom, viabilizando o intenso aproveitamento do material genético de fêmeas superiores, além de propiciar fêmeas de alto valor genético oriundas de animais com problemas reprodutivos, novilhas pré-púberes, vacas gestantes e senis (BARUSELLI et al., 2006).

Diante deste cenário, o trabalho objetivou, descrever e detalhar as atividades realizadas na área de reprodução bovina com ênfase em fertilização *in vitro* e transferência de embriões, durante o estágio supervisionado na empresa ABS Pecplan.

2 DESCRIÇÃO DO LOCAL E PERÍODO DO ESTÁGIO

A central onde foi realizado o estágio está localizada no município Delta-MG, rodovia BR-050 KM 196.

ABS Global, faz parte do grupo GENUS e é uma empresa considerada líder mundial em genética bovina, fundada nos Estados Unidos em 1941. Atualmente, a empresa coleta e comercializa aproximadamente 17 milhões de doses de sêmen por ano ao redor do mundo e produz cerca de 450.231 embriões por ano no Brasil. Trabalha fornecendo genética destinada a melhoria nas produções de leite e carne de forma mais sustentável. Além das centrais no Brasil, a empresa conta com filiais na Europa, América Latina, América do Norte e Índia, e fornece genética para clientes de leite e carne na América do norte, América Latina, Ásia e Europa.

Em 2018 se juntou ao laboratório especializado em fertilização *in vitro* bovina, a In Vitro Brasil (IVB), líder mundial na produção *in vitro*, onde foi realizado parte do estágio.

Também foi realizado o estágio a campo, acompanhando os veterinários responsáveis pelos procedimentos de Transferência de Embrião em Tempo Fixo (TETF); Diagnóstico de Gestação (DG) e Sexagem Fetal nas propriedades clientes da empresa.

O estágio supervisionado foi realizado no período de 08 de dezembro de 2021 a 11 de maio de 2022 sendo parte no campo e parte no laboratório. Sob supervisão de Pedro Figueiredo Quelhas que atua como supervisor de campo e Samantha Bielert do Nascimento que atua como supervisora de laboratório na empresa.

2.1 Instalações

O laboratório de PIVE é dividido em setores de acordo com as atividades realizadas, com divisão de áreas limpas e áreas sujas, contendo uma sala para recepção, sala para epi's (Equipamentos de Proteção Individual), estoque de materiais, estoque de sêmen e embriões congelados, sala das incubadoras juntamente com os fluxos onde são feitos os procedimentos, sala de DT (Direct Transfer) e sala de campo.

2.2 Aspiração Folicular

A coleta dos oócitos é realizada pelos médicos veterinários da empresa responsáveis por essa etapa. O procedimento é feito com o auxílio de um ultrassom e um transdutor acoplado à guia de aspiração. O oócito é aspirado com uma agulha própria que perfura o folículo, para a coleta deste é acionado um sistema a vácuo com pressão negativa.

Depois de aspirados, os oócitos passam pelo processo de seleção, realizado por um selecionador. A classificação se dá de acordo com as camadas de células do cúmulus e regularidade do citoplasma, sendo Grau I, II, III e desnudos.

Figura 1– Manejo de aspiração folicular



Fonte: Victor Guimarães (2022).

2.2.1 Seleção das receptoras

Esta é uma etapa de extrema importância para se obter bons resultados e é feita de forma criteriosa pelos médicos veterinários responsáveis pela Transferência de Embriões. As receptoras devem ser vacas saudáveis e dentro dos padrões mínimos de qualidade. Alguns critérios são necessários para atender essa seleção, como, animais em puberdade, vacinação em dia, exame de brucelose e tuberculose precisam testar negativos, não se deve deixar as receptoras com touro no mínimo 30 dias antes do início do protocolo, fazer o controle de ectoparasitas antes do início do protocolo, deve-se fornecer sal mineral específico para reprodução, pós-parto de no mínimo 30 dias, evitar animais que já passaram pelos processos

de IATF, monta natural e continuam vazias e animais que foram ressincronizados por 4 vezes ou mais devem ser descartados do programa de TETF.

Figura 2 - Avaliação do escore de condição corporal das receptoras



Fonte: ABS Pecplan

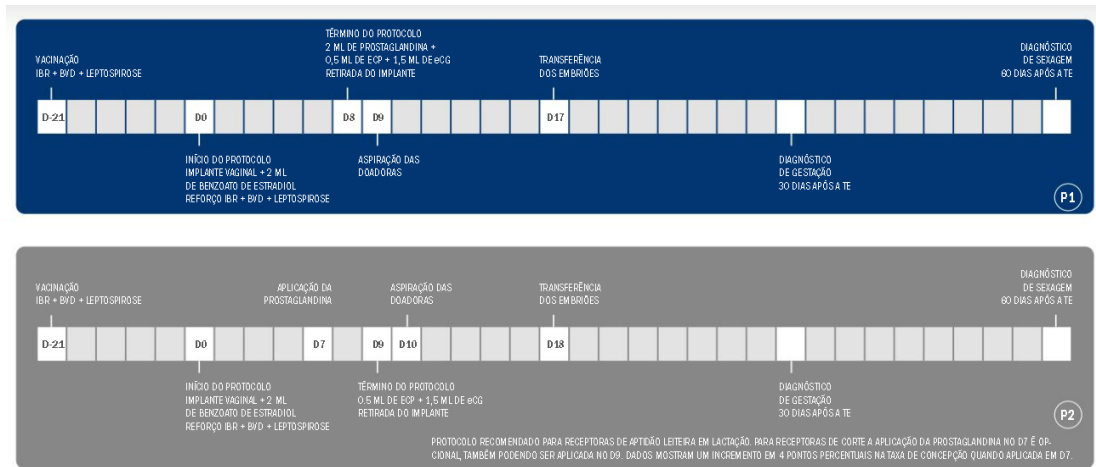
2.2.2 Método de avaliação das receptoras

A avaliação deve ser feita através da palpação retal e utilização do aparelho de ultrassom, para verificar se o útero está totalmente involuído, presença de algum tipo de infecção, como metrite, endometrite e outras; espessura e tônus uterino, presença de corpo lúteo e folículo dominante e se há problemas na cérvix que dificulte a passagem do inovulador.

2.2.3 Protocolos de sincronização das receptoras

As vacas que foram avaliadas e consideradas aptas a entrarem no protocolo recebem no Dia 0 (D0) um implante intravaginal de liberação lenta de progesterona (P4) e 2 mL de benzoato de estradiol. No dia 8 (D8) o implante de P4 é retirado e administrado via intramuscular 2 mL de prostaglandina (PGF2 α), 0,5 mL de cipionato de estradiol (ECP) e 1,5 mL de gonadotrofina coriônica equina (eCG). A transferência é realizada no dia 17 (D17) do protocolo.

Figura 3 - Etapas de trabalho e recomendações do protocolo de sincronização



Fonte: ABS Pecplan

2.2.4 Seleção e maturação dos oócitos

Após a Aspiração Folicular, realizada por uma equipe da ABS ou por terceiros, os oócitos que foram aspirados, selecionados e classificados são colocados em tubos de maturação, com meio de maturação e óleo mineral preparados previamente no laboratório, e posteriormente transportados até a central através de uma transportadora de oócitos com temperatura controlada que fica em torno de 38,5°C, são deixados no laboratório e mantidos em uma incubadora a 38,7°C, com 90% de N₂, 5% O₂ e 5% CO₂ e umidade saturada, por 24h. O processo de seleção dos oócitos é considerado o dia -1 (D -1).

O processo de classificação dos oócitos à campo consideram os parâmetros de quantidade de células da granulosa (Complexo Células Cumulus-COO'S) ao redor do oócito e o aspecto do citoplasma, sendo o melhor oócito aquele que possui mais de 3 camadas de células ao seu redor e o ooplasma mais homogêneo e escuro. Com essas informações os oócitos podem ser classificados em graus I, II, III e desnudos, sendo I com maior número de células do cumulus e desnudos sem nenhuma célula.

Figura 4 - Incubadoras com temperatura controlada e gases estabilizantes



Fonte: Do Autor (2022).

2.2.5 Fecundação *in vitro* dos oócitos (FIV)

A FIV é realizada em placas de 35mm que podem ter até 5 gotas com meio FIV imersas em óleo mineral e adicionado antibiótico, heparina e PHE (penicilamina, hipotaurina e epinefrina). Cada gota deve conter no máximo 35 oócitos que passam por um processo de lavagem, para ser fecundado. Depois da lavagem e separação dos oócitos nas gotas, são adicionados os espermatozoides e realizada a fecundação.

Antes de ser realizada a fecundação, são descongeladas as doses de sêmen dos touros que foram escolhidos para o acasalamento. O sêmen fica armazenado em palhetas, mantidos em botijões com nitrogênio na sala de estoque.

O descongelamento é feito em um descongelador próprio e depois o sêmen é preparado utilizando o método de Percoll, sendo transferido para *ependorfs*, adicionado uma solução de percoll e submetido ao protocolo de centrifugação, formando-se um sobrenadante que contém componentes do líquido seminal, sujidades e espermatozoides mortos, esse sobrenadante é removido com o auxílio de uma pipeta e os espermatozoides viáveis que ficaram no fundo, são transferidos para outro *ependorf*. É feita a avaliação dos espermatozoides nesse momento, antes de ser adicionado nas gotas contendo oócitos, observando sua motilidade e vigor e se estiver dentro dos padrões ideais o procedimento continua.

As placas contendo os oócitos fecundados são armazenadas em incubadoras durante 18 a 22h nas mesmas condições atmosféricas da maturação. O processo da FIV é considerado dia zero (D0).

Figura 5 - Centrífuga para sêmen



Fonte: Do Autor (2022).

2.2.6 Cultivo *in vitro* (CIV)

Após o período de incubação com sucessivos eventos de mitoses das células, há a diferenciação celular, essas estruturas são lavadas, através de 3 gotas, sendo a primeira com meio de lavagem, a segunda com meio de lavagem + meio de cultivo e a terceira gota apenas com meio de cultivo. Depois da lavagem, faz-se a avaliação e contabilização dos possíveis zigotos. O processo de cultivo *in vitro* é considerado dia 1 (D1).

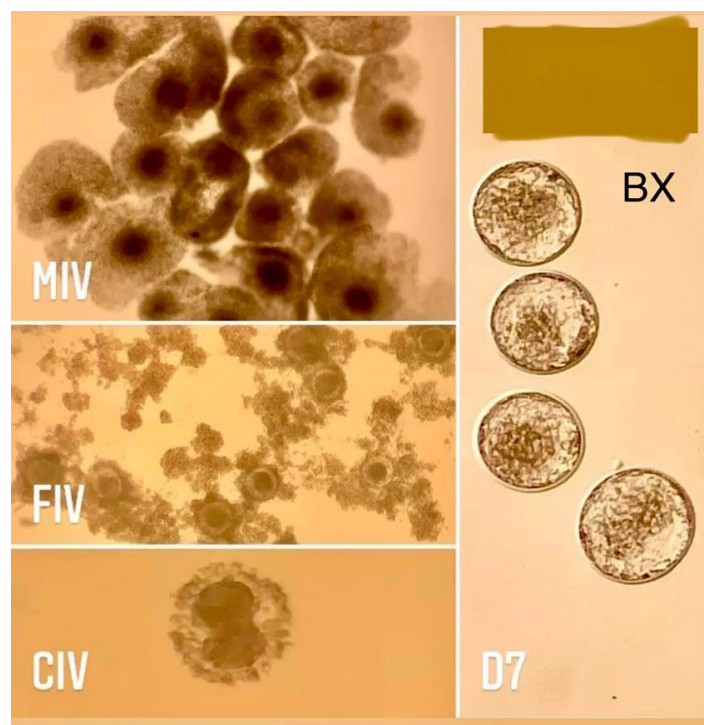
2.2.7 Clivagem

Os embriões permanecem na incubadora e só são retirados no dia 4 (D4) para avaliar e contabilizar as estruturas que passaram pelo processo de clivagem, que sofreram divisões mitóticas durante o período de incubação. Aquelas estruturas que não desenvolveram e não possuem mais que duas células são retiradas das gotas e após a contagem é adicionado o meio C5.

2.2.8 Avaliação do desenvolvimento embrionário (previsão)

No sexto dia (D6) é realizada a previsão, que consiste na contagem dos embriões viáveis para envasar no próximo dia. Eles são transferidos para os tubos de previsão que contém H-SOF e óleo mineral.

Figura 6 - Etapas do processo de FIV



Fonte: Osvaldo Bernal (2022)

2.2.9 Envase

O envase é feito no dia 7 (D7) e corresponde à passagem dos embriões que estão nos tubos, para palhetas próprias de congelamento ou transferência (TE). Nessa etapa espera-se que a maioria das estruturas se encontrem no estágio de blastocisto, podendo ser Bi (blastocisto inicial), Bl (blastocisto), Bx (blastocisto expandido), Bn (blastocisto eclodindo) ou Be (blastocisto eclodido). Os embriões podem ser envasados a fresco (para TE no mesmo

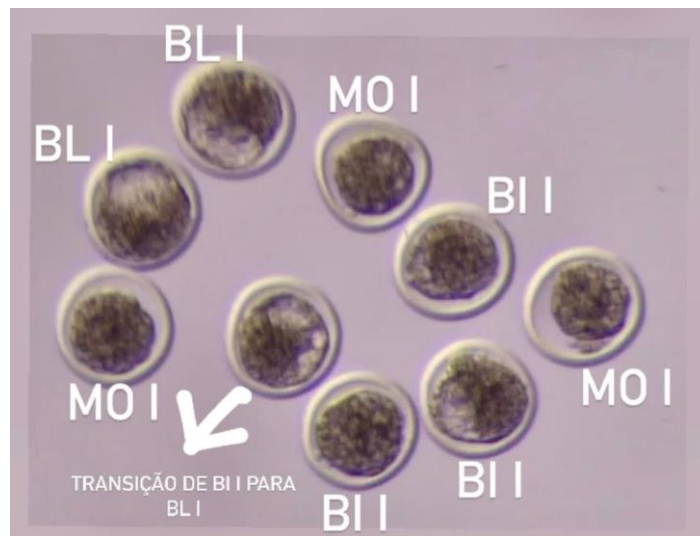
dia) ou podem ser criopreservados por vitrificação (congelamento rápido) ou direct transfer (congelamento lento).

Figura 7 - Classificação dos estágios embrionários

Blastocisto inicial (Bi)	Blastocisto (BL)	Blastocisto Expandido (Bx)	Blastocisto Eclodido (Be)
			
Tamanho menor do embrião	Tamanho intermediário do embrião	Tamanho maior do embrião	Tamanho muito maior do embrião
Blastocele < 50% do embrião	Blastocele > 50% do embrião	Blastocele grande	Blastocele grande
		Massa celular interna bem definida	Massa celular interna bem definida

Fonte: NIDUS 2020

Figura 8 - Classificação embrionária



Fonte: Osvaldo Bernal (2022)

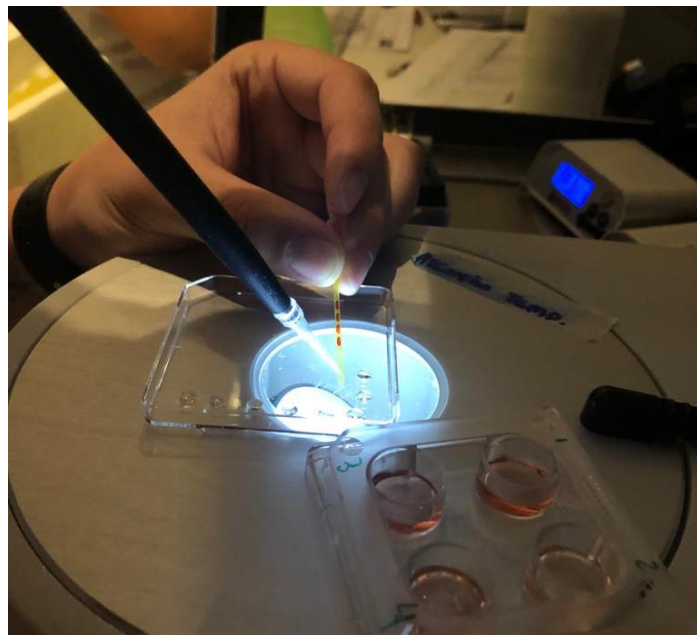
No envase a fresco, os embriões são colocados em palhetas que são fechadas com lacradores específicos, numerados de acordo com o acasalamento, logo em seguida, guardados em transportadoras de embriões com temperatura controlada (36 a 37°C) para serem levados ao campo.

No congelamento lento, Direct Transfer (DT) é utilizado um gradiente de temperatura em que os embriões são expostos, o procedimento é realizado com uma máquina programável que proporciona temperaturas cada vez mais baixas ($-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e automaticamente a curva de resfriamento ideal.

Já na vitrificação os embriões são adicionados em solução crioprotetora (etilenoglicol e DMSO) divididos na placa de 4 poços, sendo o primeiro com $400\mu\text{l}$ de meio de manutenção, $50\mu\text{l}$ de etilenoglicol e $50\mu\text{l}$ de DMSO, no segundo poço são colocados $300\mu\text{l}$ de meio de manutenção, $100\mu\text{l}$ de etilenoglicol e $100\mu\text{l}$ de DMSO e nos poços 3 e 4 apenas $400\mu\text{l}$ de meio de manutenção. Os embriões são transferidos para o poço 1 onde ficam por 1 minuto e depois são depositados e uma gota do meio do poço 2 e logo em seguida são colocados em OPS (open pulled straw) que são imersas em nitrogênio líquido quase imediatamente.

Após serem congelados em ambos os métodos, as palhetas ou OPS's contendo embriões são colocadas em raques identificadas e armazenadas em botijões de nitrogênio.

Figura 9 - Procedimento de vitrificação de embriões



Fonte: Do Autor (2022)

2.2.10 Desvitrificação

No dia da TE, os embriões que foram vitrificados passam pelo processo de desvitrificação para serem transportados e transferidos nas receptoras. Este processo consiste no descongelamento das OPS's de acordo com as preferências do proprietário. A OPS é

retirada do botijão e colocada em contato com meio que foi aquecido anteriormente e adicionados à placa de 4 poços, contendo meios capazes de rehidratar os embriões, no poço 1 800µl de meio manutenção e 400µl de S1M, os embriões são depositados nesse poço e em seguida transferidos para o poço 2, que contém 400µl de meio manutenção e 200µl de S1M onde ficam por 5 minutos, após esse tempo eles são trocados para o poço 3, com 400µl de meio manutenção e 100µl de S1M onde ficam por mais 5 minutos, posteriormente são retirados e adicionados à uma gota de 50µl de H-SOF para serem envasados nas palhetas de transferência de embriões.

2.3 Manejo das doadoras

A empresa realiza algumas recomendações em relação ao manejo das vacas que serão doadoras, elas devem estar em boa condição corporal, deve-se fornecer a dieta adequada para que elas mantenham o peso. Há também a recomendação da administração de Fosfosal, ADE ou Kit Adaptador, 15 dias antes da aspiração e continuar a aplicação quinzenalmente durante o período de coleta de oócitos.

2.3.1 Transferência de embriões

No dia da transferência dos embriões (D17), as receptoras passam novamente por avaliação, mas dessa vez é para verificar se há presença de corpo lúteo, confirmando se o animal respondeu ao protocolo hormonal. A avaliação é feita pelo médico veterinário através da palpação retal com auxílio do aparelho de ultrassom. Se houver a confirmação da ovulação, o CL é classificado de acordo com o tamanho e observado em qual ovário está (esquerdo ou direito).

Após a avaliação e anotação das informações na ficha de TE, o embrião escolhido é retirado da transportadora e inserido em uma bainha para TE que está envolta com camisinha sanitária, o inovulador é montado e entregue ao veterinário que insere no canal vaginal da vaca, guiando através do reto, até a cérvix, onde se rompe a camisinha depois de passar o primeiro anel da cérvix. A transferência deve ser feita no corno ipsilateral onde foi identificado o CL no ovário.

Figura 10 - Mesa montada para transferência de embriões



Fonte: Pâmella Alves Correia (2022).

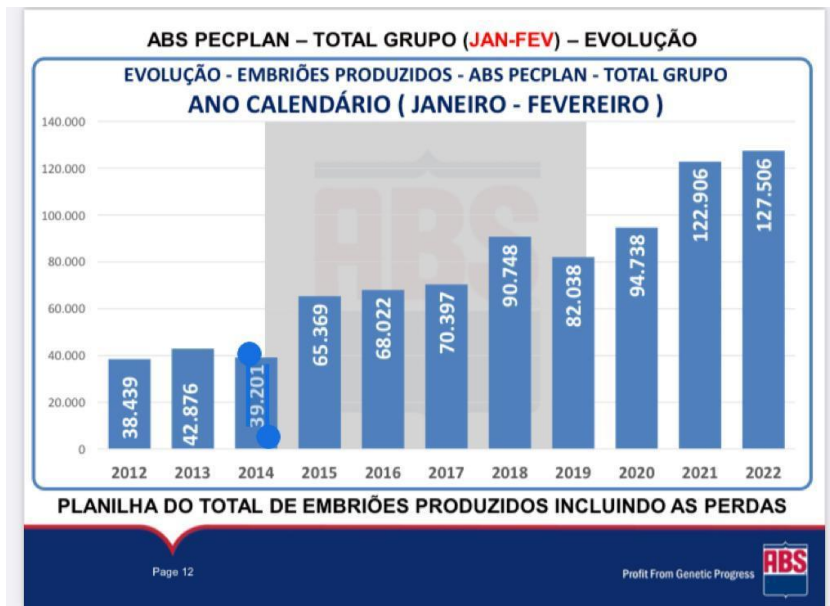
2.3.2 Diagnóstico de gestação e sexagem fetal

Após 23 dias que foi realizada a TETF, ou seja, quando o embrião está com 30 dias de desenvolvimento, é feito o diagnóstico gestacional pelo médico veterinário da empresa, com o auxílio do aparelho de ultrassom. As vacas que não emprenharem podem retornar ao protocolo de acordo com a avaliação do veterinário. Entre 60 a 75 dias de desenvolvimento do feto, é realizada a sexagem fetal.

2.4 Volumes de produção

De acordo com os dados coletados e disponibilizados pela empresa, a produção de embriões nos meses de Janeiro e Fevereiro de 2012 a 2022 cresceram exponencialmente, levando em consideração todos os grupos da ABS Pecplan.

Figura 11 - Total de embriões produzidos ABS Pecplan Global



Fonte: ABS Pecplan (2022).

Em relação a ABS Brasil não foi diferente, desde 2012 a produção vem aumentando nos meses de Janeiro e Fevereiro, como mostra a figura 12.

Figura 12 - Total de embriões produzidos ABS Pecplan Brasil

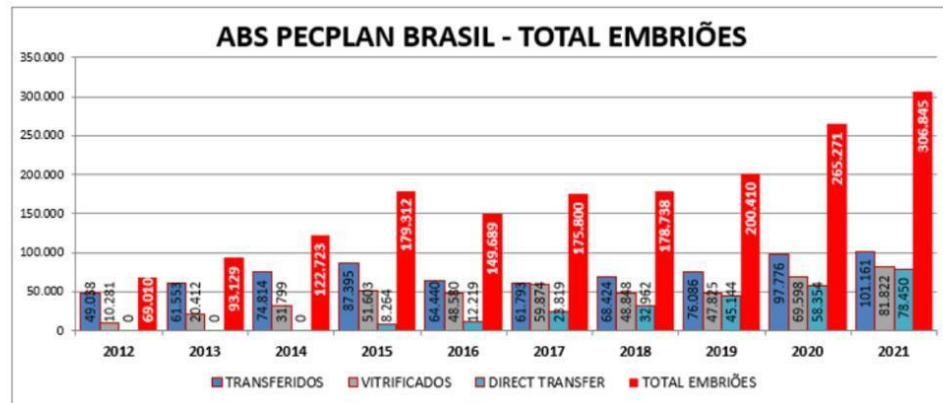


Fonte: ABS Pecplan (2022).

Na figura 13, é possível observar que de 2012 a 2014 os embriões produzidos eram destinados apenas a TE e vitrificação, após o uso da técnica de direct transfer (2015), o

número de embriões produzidos teve um aumento notável e com o passar dos anos a técnica quase alcançou os mesmos números de transferidos e vitrificados.

Figura 13 - Total de embriões transferidos, vitrificados e direct transfer na ABS Pecplan Brasil

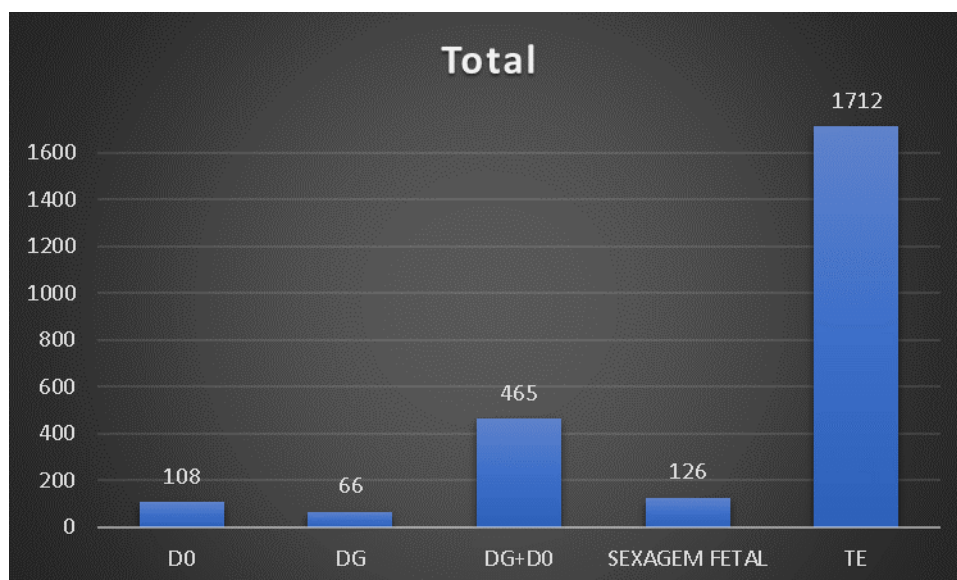


Fonte: ABS Pecplan (2022).

2.5 Procedimentos acompanhados durante o estágio

Durante o período de estágio foi realizado o armazenamento de dados das atividades acompanhadas em vários estados, que estão dispostos nos gráficos a seguir.

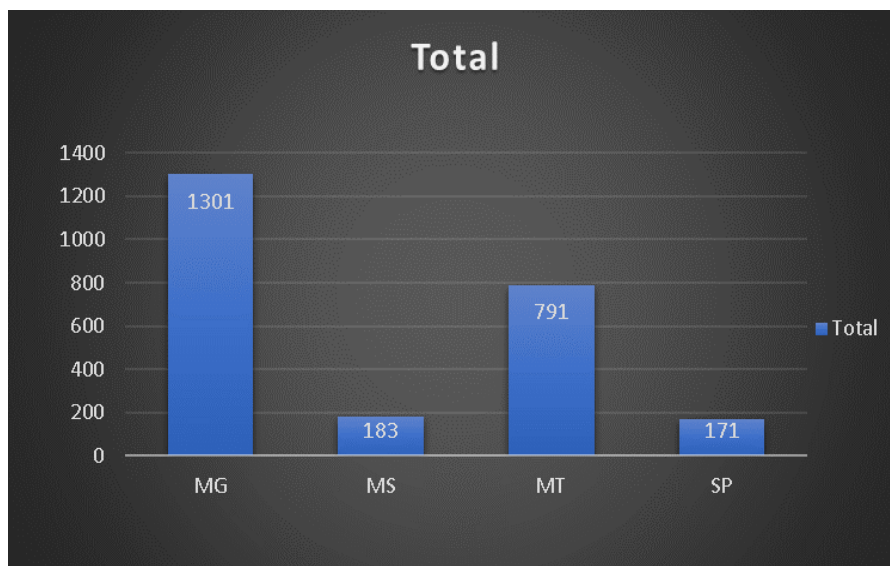
Gráfico 1 - Total de atividades acompanhadas a campo



Fonte: Do autor (2022).

É possível afirmar pelo gráfico a seguir que as atividades acompanhadas foram mais frequentes no estado de Minas Gerais e Mato Grosso.

Gráfico 2 – Atividades realizadas em relação ao estado



Fonte: Do autor (2022).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Histórico da Produção *in vitro* de Embriões

A produção *in vitro* de embriões é uma biotécnica que permite a junção entre espermatozoide e oócito levando a formação de um novo indivíduo fora do trato reprodutivo da fêmea. Para ser realizada são necessários os processos de coleta dos oócitos, maturação *in vitro*, fecundação *in vitro* e o cultivo *in vitro* de zigotos e embriões externamente ao útero animal (GONÇALVES ET AL., 2008).

Com interesse em desenvolvimento de organismos superiores e aspectos reprodutivos, pesquisadores iniciaram os estudos com a finalidade de determinar metodologias e procedimentos que permitissem a manipulação dos embriões. A primeira célula futura de um embrião foi observada entre 1877 e 1879, onde foi visualizada a primeira fecundação de um oócito de estrela do mar. Ao contrário dos mamíferos, os invertebrados marinhos realizam a fecundação externamente ao sistema reprodutor feminino, devido a isso, eles passaram a ser objetos de estudos das primeiras pesquisas (ANDREOTI, 2007; SANTOS, 2010).

Em mamíferos, apenas em 1929 houve o primeiro relato de cultivo de embriões de coelhos, e em 1959 obteve-se o primeiro nascimento de coelho gerado a partir da FIV

(STEPTOE E EDWARDS, 1978). Em 1978, na Inglaterra obteve-se um marco na história da PIV no mundo com o nascimento do primeiro bebê humano, a partir de um oócito fecundado *in vitro*, Louise Brown, chamado, bebê de proveta (GARCIA et al., 2004).

Já em relação aos animais de produção, somente na década de 80 surgiram os relatos sobre MIV e FIV de oócitos bovinos e em 1982, nos Estados Unidos nasceu o primeiro bezerro (BRACKETT et al., 1982).

Em 1990, deu início a PIV no Brasil, após a aprovação de um projeto de inovação tecnológica da Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Os primeiros nascimentos a partir da PIV de embriões bovinos no Brasil foram obtidos em 1994 (ALVES et al., 2003). Nessa época o país consolidou a produção e transferência de embriões bovinos, a atividade contava inclusive com uma sociedade científica específica (SBTE, Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões) que foi criada em 1985 (RUBIN, 2005). Entretanto, o Brasil ainda era uma referência apenas regional na atividade, correspondendo por 68,3% do total mundial de transferência de embriões produzidos *in vitro* (THIBIER, 1998).

Já em 2007 o Brasil se tornou o maior produtor de embriões *in vitro*, com 48,0% do total mundial, sendo o maior responsável pelo crescimento de 10,5 vezes desse segmento, observado desde 1997 (VIANA, et al. 2012).

Atualmente a PIV tem sido utilizada em grande escala comercialmente e por diversos laboratórios no país para pesquisa e multiplicação genética na produção animal, graças à evolução nos processos de cultivos desde os primeiros estudos (RUMPF, 2007).

3.2 Reprodução bovina

Alguns mecanismos endócrinos são responsáveis pela reprodução bovina e conseqüentemente pelo desenvolvimento folicular da fêmea, tendo como exemplo a principal atuação os hormônios GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas), FSH (Hormônio Folículo Estimulante), LH (Hormônio Luteinizante), estradiol (E2) e progesterona (P4) que atuam na evolução e maturação dos folículos (SANTOS, 2017).

O GnRH atua no hipotálamo, uma estrutura localizada na base do cérebro, que age diretamente na adeno-hipófise produzindo hormônios chamados de gonadotrofinas (LH e FSH). O FSH é responsável pelo desenvolvimento e maturação folicular e o LH pela dominância folicular e ovulação. O estradiol é produzido pelo ovário e está relacionado a

manifestação de cio, já a progesterona, produzida pelo corpo lúteo (CL) é responsável pela manutenção da gestação (CUNNINGHAM, 2001).

3.2.1 Ciclo estral na fêmea bovina

As fêmeas bovinas apresentam ciclos reprodutivos ao longo de todo ano, com intervalos por volta de 21 dias, ou seja, são animais poliéstricos contínuos (BENITES; BARUSELLI, 2011). Quando ocorre gestação ou alguma doença reprodutiva ou metabólica esses ciclos podem ser interrompidos. A puberdade de uma vaca varia entre 12 e 14 meses de idade, isso vai depender das características presentes na raça, características individuais da vaca e também é influenciada pela nutrição que ela recebe (BALL; PETERS, 2004; UNAM, 2007).

O ciclo estral é composto por quatro estágios e divididos em duas fases, os estágios são: proestro, estro, metaestro e diestro (MIES FILHO, 1987), e as fases luteal e folicular (a primeira, fase folicular, corresponde aos estágios do proestro e estro e está sobre o efeito do hormônio estrógeno) e a fase lútea (compreende a fase do metaestro e diestro e está sobre efeito da progesterona) (BALL; PETERS, 2006). A fisiologia do ciclo estral é bastante complexa e envolve sistema nervoso central (hipotálamo e hipófise) e os órgãos genitais (útero e ovários) (REICHENBACH et al., 2002).

O proestro é o primeiro estágio, onde ocorre o início da regressão do CL, conseqüentemente queda da progesterona, aumentando assim os níveis de estrógeno nesse período. Após essa transição ocorre a ovulação (SOARES; JUNQUEIRA, 2019). É possível que a ovulação ocorra sem essa troca significativa dos níveis de P4 e E2, isso pode ocorrer em animais pré-púberes e fêmeas que estão no pós-parto (MORAES et al., 2002; JAINUDEEN et al., 2004).

O estro é o estágio em que os níveis de estrógeno sérico estão altos e é nessa fase que o animal apresentará receptividade sexual e manifestação do cio. A duração é em média de 12 a 18 horas, podendo variar de acordo com a raça e outros fatores. Vacas zebuínas tem o período de cio mais curto que animais europeus. Os sinais apresentados pela vaca nesse estágio são: maior agitação e locomoção, mugidos frequentes, vulva edemaciada, mucosa vestibular e vagina hiperêmica, corrimento vaginal de cor transparente. Porém esses sinais também podem estar presentes na fase de proestro, com isso, para melhor identificação do cio, a aceitação de monta é o mais confiável. (BALL; PETERS, 2006; DIRKSEN; GRÜNDER; STÖBER, 2013; THOMPSON, 2006).

O metaestro é o estágio onde ocorre a ovulação, em média 12 horas após o final do estro, ele tem uma duração por volta de dois a três dias. A partir disso, a fêmea não vai mais aceitar a monta e pode ser observado em alguns animais secreção de muco com presença de sangue. Após a ovulação, as células do folículo ovariano vão se reorganizar e multiplicar, formando o corpo lúteo, que possui a função de produzir progesterona (DIRKSEN; GRÜNDER; STÖBER, 2013; GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

Em seguida vem o diestro, o estágio com maior duração, por volta de 15 dias. É nesse período que ocorre alta secreção de progesterona pelo corpo lúteo. O animal apresenta a mucosa vestibular e vaginal na cor rosa pálido e não muito úmida, e a cérvix fica fechada por meio de um tampão mucoso. No final desse período, se não tiver a presença de gestação, é estimulada a síntese de prostaglandina ($PGF2\alpha$) no endométrio do útero, que realiza a luteólise do corpo lúteo, com isso há queda nos níveis séricos de P4, cessando o feedback negativo sob o eixo hipotalâmico-hipofisário, iniciando um novo ciclo estral. Porém, se o animal ficou gestante, a luteólise é bloqueada, mantendo o corpo lúteo e os níveis de progesterona para manterem a gestação (BALL; PETERS, 2006).

O anestro é definido por uma inatividade sexual, ou seja, quando o ciclo estral não está acontecendo adequadamente, portanto a fêmea não apresentará nenhum comportamento de estro, devido a problemas no desenvolvimento de folículos ovarianos. O motivo desse quadro de anestro é devido a deficiência de gonadotrofinas, e as causas são, a transferência de uma estação reprodutiva para outra, freemartinismo, ovários císticos, deficiências nutricionais e em alguns animais pela lactação. Também, pode haver casos de permanência do corpo lúteo, quando tem a presença de feto mumificado e piometra (JAINUDEEN; HAFEZ, 2004).

3.2.2 Controle endócrino do ciclo estral

A secreção do GnRH se dá de duas formas, em dois centros diferentes do hipotálamo, sendo que um secreta de forma contínua e o outro em grandes quantidades de uma vez, conseqüentemente a onda pré-ovulatória é controlada através da estimulação de liberação de FSH e LH pela hipófise anterior, esses hormônios caem na corrente sanguínea e chegam aos ovários onde atuam na maturação dos folículos (BURATINI, 2007).

Após a maturação, há a produção de estradiol pelos folículos que através da corrente sanguínea gera um feedback negativo no hipotálamo no centro de secreção contínua de GnRH e um feedback positivo no centro pré-ovulatório e na hipófise (FORTUNE et al, 2004).

Os sinais de cio são demonstrados pela fêmea quando a quantidade de estrógeno atinge um certo nível. Nesta fase, os folículos começam a produção de inibina, que tem função de fazer feedback negativo sobre a liberação de FSH na hipófise, isso impede um novo crescimento folicular (STABENFELDT; EDQVIST, 1996).

Com isso, o folículo dominante sofre diferenciação, apresenta receptores e passa a ser dependente de LH, enquanto que os folículos subordinados regridem devido a baixa concentração de FSH (BURATINI, 2007).

A ovulação ocorre devido a um pico de LH, ou seja, quando o centro hipotalâmico pré-ovulatório libera uma grande quantidade de GnRH, que estimula a liberação do hormônio luteinizante. Posteriormente as células residuais do folículo sofrem um processo de luteinização que dá início a formação do corpo lúteo, este que é responsável pela produção de progesterona e atingirá sua competência após cinco dias (MORAES et al, 2001).

A progesterona em níveis elevados, realiza feedback negativo no hipotálamo, mantendo a secreção de GnRH em níveis basais, consequentemente FSH e LH também se mantêm em baixas concentrações (BARUSELLI, 2000).

3.3 Aspiração folicular

A OPU é um método físico guiado por ultra-sonografia transvaginal para realizar a aspiração dos folículos maiores ou iguais a 5 mm de diâmetro. É realizada com o auxílio do ultrassom e um transdutor acoplado a um guia de aspiração, através de uma agulha própria, com 18 a 19 G, no interior dos folículos ovarianos (AVELINO, 2002). Após a inserção da agulha, um sistema de bomba a vácuo com uma pressão negativa ideal, ajustada para cada sistema e bombas, permite a recuperação dos oócitos e do líquido folicular para um tubo coletor. Geralmente a pressão da bomba a vácuo varia entre 60 a 100 mm de mercúrio (GALLI, 1996).

Após a coleta dos oócitos através da OPU, é realizada a seleção dos mesmos, utilizando uma lupa estereoscópica para visualização, a seleção se dá de acordo com o número de camadas de células do cumulus e o aspecto do citoplasma do oócito (NAGAI, 2001).

A aspiração folicular, em geral, não ocasiona danos ao sistema reprodutor da vaca, embora em alguns casos já tenha sido relatada a proeminência de tecido conjuntivo no parênquima ovariano de algumas doadoras que estavam sendo aspiradas de 15 em 15 dias (THOMPSON, 2000).

A técnica de OPU permite uma maior flexibilidade em relação a TE, as doadoras podem ser aspiradas a partir dos 6 meses de idade, vacas prenhes até o terceiro mês de gestação e entre 2 a 3 semanas após o parto (GALLI et al., 1996). A frequência pode variar em intervalos de duas semanas ou de forma aleatória durante várias semanas ou meses (NAGAI, 2001).

3.4 Maturação *in vivo*

Após serem aspirados dos folículos ovarianos, os oócitos ainda não estão aptos a serem fecundados e precisam passar por uma série de transformações do núcleo e do citoplasma, que representa a maturação oocitária (GALLI et al., 2003). *In vivo* a maturação tem início logo após o pico de LH, enquanto que na OPU este processo se inicia com a remoção do oócito do interior do folículo (HOSHI, 2003). A maturação nuclear ocorre com a passagem da fase de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica para o estágio de metáfase II, essa diferenciação dura aproximadamente entre 18 a 22 horas (THOMPSON et al., 2000). Também ocorrem modificações nas células somáticas que envolvem o oócito, responsáveis por funções importantes na maturação nuclear e citoplasmática, como a passagem de nutrientes e proteínas reguladoras através das junções tipo gap (NAGAI et al., 2001).

A maturação oocitária *in vitro* só será possível se todos os meios utilizados durante o processo mimetizem as condições encontradas durante o processo de maturação *in vivo* (SANGILD, 2000). A grande maioria dos laboratórios tem optado pelo método de suplementação do meio de maturação com soro fetal bovino (SFB) e gonadotrofinas (FSH, LH e estradiol) em condições controladas de atmosfera gasosa e temperatura (RODRIGUES et al., 2000). A atmosfera gasosa geralmente utilizada em sistemas de MIV é de 5% de CO₂ e 20% de O₂ com umidade saturada. O CO₂ é utilizado para controlar o potencial de hidrogênio (pH) dos meios tamponados com bicarbonato, portanto, alguns sistemas de PIVE já utilizam mistura de gases contendo 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂. Após o tempo de incubação da MIV, os oócitos completam a maturação com a extrusão do primeiro corpúsculo polar, encontrando-se apto para fecundação (AVELINO et al., 2002).

3.5 Seleção e classificação dos oócitos

A seleção é baseada em características do cumulus e do citoplasma do oócito, eles podem ser classificados em grau I, II, III e IV como mostra a figura 14.

Figura 14 - Classificação dos oócitos

Qualidade	Descrição
Grau I	Oócitos com mais de três camadas de células compactas do <i>cumulus</i> , e citoplasma regular.
Grau II	Oócitos com uma a três camadas de células do <i>cumulus</i> , citoplasma regular ou apresentando granulações finas.
Grau III	Oócitos apresentando menos de três camadas do <i>cumulus</i> ou parcialmente desnudos, citoplasma irregular.
Grau IV	Desnudos (oócitos sem células do <i>cumulus</i>) ou em degeneração (com <i>cumulus</i> expandido e citoplasma heterogêneo apresentando granulações severas).

Fonte: EMBRAPA (2014).

3.6 Fecundação *In Vitro* (FIV)

O processo de fertilização *in vitro* requer o uso de espermatozoides de palhetas de sêmen congelado que geralmente é obtido pelo sistema de separação pelo gradiente de Percoll após o descongelamento (GALLI, 1996). Para ocorrer a fecundação, é necessário que o espermatozoide passe pelo processo de capacitação espermática que *in vitro*, é desencadeado por glicosaminoglicanas, como a heparina, que são adicionadas nos meios de fecundação. A concentração utilizada para fertilização *in vitro*, em geral, é de 2×10^6 espermatozoides/ml, levando em consideração a motilidade e concentração da fração viva de espermatozoides obtida após a centrifugação em gradiente de Percoll, que é composto por partículas de sílica coloidal coberto com polivinilpirrolidona, preparado em diferentes concentrações para formar um gradiente descontínuo de duas ou três fases (90, 45 e 30%) para separação espermática (YOUNG, 1998).

3.7 Cultivo *in vitro*

Após a fertilização do oócito se inicia o processo de cultivo *in vitro*, que corresponde a etapa de desenvolvimento do oócito fertilizado até o estágio de blastocisto (SANGILD et al., 2000). Nesse período ocorrem os eventos como ativação do genoma embrionário, processo de divisão celular, compactação dos blastômeros no estágio de mórula e início da diferenciação embrionária com a formação da blastocele (HOSHI, 2003).

Processos como clivagem, diferenciação do trofoblasto e embrioblasto, formação e expansão da blastocele e rompimento da zona pelúcida acontecem nesse período pré-implantação, e podem ser afetados por diferentes formas de cultivo *in vitro*, o ponto mais crítico se dá por volta do estágio de 8 a 16 células, quando ocorre a ativação do genoma embrionário (MEMILI e FIRST, 2000).

As condições de cultivo *in vitro* são consideradas muito importantes para alcançar bons índices de produção de embriões, sabendo disso, inúmeras pesquisas tem sido realizadas visando avaliar o efeito que diferentes fatores possam exercer sobre o metabolismo e capacidade de desenvolvimento desses embriões, como a composição dos meios de cultivo e condições de temperatura e atmosfera gasosa, adição de aminoácidos, vitaminas, macromoléculas e fatores de crescimento (NAGAI, 2001).

3.7.1 Desenvolvimento embrionário em bovinos

Nos primeiros estádios de desenvolvimento, onde ainda não apresenta formas anatômicas visíveis da espécie, o organismo é denominado, embrião. Após apresentar formato e possível identificação da espécie é denominado, feto. A formação desses organismos se dá após a fecundação do oócito pelo espermatozoide, chamado de singamia, que ocorre na ampola da tuba uterina em bovinos dando formação ao zigoto (WATSON & BARCROFT, 2001).

Após a formação do zigoto, ocorre sucessivas clivagens, que são as divisões mitóticas da célula, passando por 2, 4 e 8 células totipotentes que posteriormente vão dar origem aos componentes fetais e placentários, as células embrionárias são denominadas blastômeros (SENGER, 2003).

Nos estádios com 16 a 32 células passa a ser chamado de mórula, é quando surge as junções tipo GAP nas células internas fazendo com que elas permaneçam fortemente unidas, devido a sua compactação, se torna difícil a contagem dos blastômeros, a formação da blastocele se dá devido ao sódio que é bombardeado para espaços intercelulares, com isso a água entra por osmose e se acumula nesses locais (STANTON et al, 2003).

Após o acúmulo de líquido e a blastocele serem estabelecidos, é formado a porção embrionária dos blastocistos, com a diferenciação as células externas passam a ser trofoblásticas e darão origem a porção embrionária da placenta. As células internas constituirão o endoderma primitivo e mais tarde o saco vitelino (SENGER, 2003).

Para que haja a implantação embrionária, é preciso que o blastocisto aumente o número de células e acumule líquido suficiente para exercer pressão sobre a zona pelúcida até ocorrer a eclosão deste, após este processo as células do embrião entra em contato direto com as células uterinas, dando início ao processo de implantação embrionária (WATSON et al., 2004).

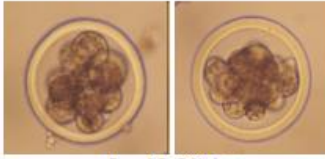
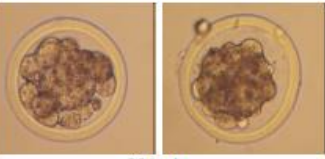


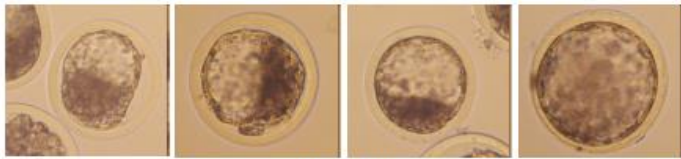
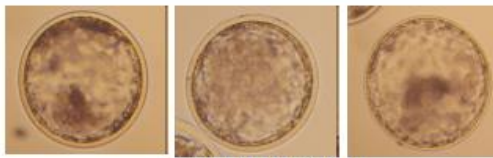
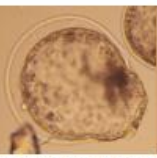
3.7.2 Avaliação e classificação dos embriões

No 6º dia de cultivo é realizada a avaliação dos embriões, visualizando se houve compactação dos blastômeros e início da formação da blastocele, e no 7º dia é feita a seleção final, para designar se será feita a transferência a fresco ou para o congelamento (THOMPSON, 2000). Essa seleção é realizada através da avaliação morfológica, visando estruturas que se apresentam aptas ao desenvolvimento pós-implantacional e com maior tolerância ao congelamento são estruturas bem desenvolvidas morfológicamente (OLIVEIRA et al., 2014).

Os critérios para classificação morfológica dos embriões bovinos produzidos *in vivo* foram normatizados pela IETS (Sociedade Internacional de Transferência de Embriões), que se dá em códigos numéricos que vão de 1 (oócito não fecundado) até 9 (blastocisto eclodido e expandido). Já a classificação em relação a qualidade do embrião vai de 1 (embriões de qualidade excelente) a 4 (embriões mortos ou degenerados) (IETS, 1998).

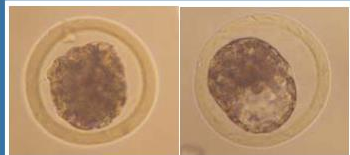
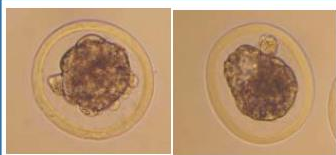
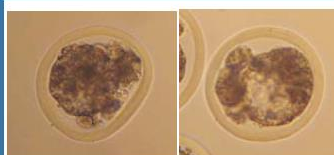
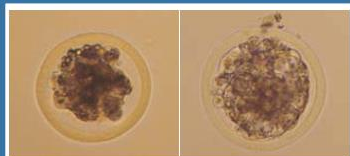
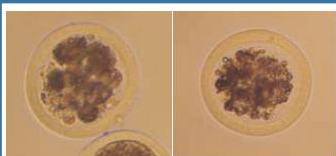
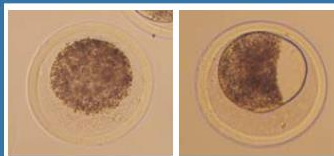
Vale ressaltar que a avaliação da qualidade embrionária é apenas um dos parâmetros para uma boa taxa de gestação após a transferência, também deve-se levar em consideração diversos fatores que influenciam, como, manipulação das estruturas, habilidade do técnico responsável, grau de sincronia entre o estágio de desenvolvimento embrionário e a fase do ciclo das receptoras.

Figura 15 - Classificação morfológica dos embriões bovinos produzidos in vivo.

 <p>8 - 12 Células Código IETS: 2</p>	 <p>Mórula Código IETS: 3</p>	<p>Mórula Fase esperada: dias 5,5-6,0 do ciclo Características: Blastômeros ainda evidentes, porém não é mais possível determinar número exato. Massa de células ocupa maior parte do espaço dentro da zona pelúcida. Período caracterizado pelo fim da fase de celularização e da transição materno zigótica e início do processo de compactação.</p>
 <p>Mórula Compacta Código IETS: 4</p>		<p>Mórula Compacta Fase esperada: dias 6,0 a 6,5 do ciclo Características: Compactação torna a massa de células coesa, dificultando individualização dos blastômeros, e causa retração do embrião em relação à zona pelúcida, com aumento do espaço perivitelínico. Formação de junções de adesão e de oclusão entre as células, preparando o embrião para a formação da blastocel.</p>
 <p>Blastocisto Inicial Código IETS: 5</p>		<p>Blastocisto Inicial Fase esperada: dias 6,5 a 7,0 do ciclo Características: Blastômeros criam gradiente osmótico que atrai água para o espaço intercelular, iniciando a formação de uma cavidade denominada blastocel. Perda da totipotência, com a formação de duas populações celulares distintas: o trofoblasto, que reveste a blastocel, e a massa celular interna (MCI), lateral à blastocel.</p>
 <p>Blastocisto Código IETS: 6</p>		<p>Blastocisto Fase esperada: dias 7,0 a 7,5 do ciclo Características: Blastocel aumenta de tamanho, tomando-se proporcionalmente maior que a massa celular interna e ocupando gradualmente todo o espaço perivitelínico. Trofoblasto sofre diferenciações morfológicas e funcionais associadas à captação de nutrientes, enquanto as células da MCI mantêm potencialidade.</p>
 <p>Blastocisto Expandido Código IETS:</p>	 <p>Blastocisto Eclodido Código IETS: 8</p>	<p>Blastocisto Expandido Fase esperada: dias 7,5 a 8,0 do ciclo Características: Expansão da blastocel causa aumento de tamanho do embrião e progressiva redução na espessura da zona pelúcida (ZP). Maior desenvolvimento do trofoblasto, a MCI é visível dependendo da posição do embrião. Rompimento da ZP caracteriza a eclosão, com o embrião entrando em contato direto com os tecidos maternos.</p>

Fonte: IETS (1998).

Figura 16 - Classificação de acordo com a qualidade dos embriões produzidos in vivo.

		
<p>Embriões de qualidade excelente Código IETS: 1</p>	<p>Embriões de qualidade boa Código IETS: 1</p>	<p>Embriões de qualidade regular Código IETS: 2</p>
<p>Comentários: Embriões sem defeitos morfológicos ou extrusões celulares, e estágio de desenvolvimento compatível com período pós-ovulação. Máximo potencial de desenvolvimento a fresco ou criopreservado.</p>	<p>Comentários: Embriões com uma ou poucas células de extrusão ou discretas alterações de coloração. Potencial de desenvolvimento semelhante ao embrião grau I, podendo também ser criopreservado.</p>	<p>Comentários: Embriões com maior número de alterações morfológicas ou extrusões celulares, mas com pelo menos 50% da massa celular íntegra e mostrando sinais de desenvolvimento.</p>
		
<p>Embriões de qualidade pobre Código IETS: 3</p>	<p>Embriões degenerados Código IETS: 4</p>	<p>Oócitos não fecundados</p>
<p>Comentários: Extrusões ou fragmentação comprometendo mais que 50% da massa celular, e dificultando a classificação das células viáveis. Potencial de desenvolvimento significativamente reduzido.</p>	<p>Comentários: Embriões com comprometimento definitivo da massa celular, com blastômeros de tamanhos variados apresentando sinais de degeneração celular, picnose, fragmentação e alterações de cor.</p>	<p>Comentários: Oócito sem sinais de clivagem, apresentando graus variados de retração, pulverização ou sedimentação do citoplasma. No menor aumento podem ser confundidos com mórula compacta ou Bi.</p>

Fonte: IETS (1998).

3.8 Métodos de criopreservação

Existem dois métodos mais utilizados para criopreservação de embriões: congelamento lento ou clássico e vitrificação. O congelamento clássico utiliza baixas concentrações de crioprotetores, porém, permite a formação de cristais de gelo que podem resultar em lesões às membranas e organelas. A queda da temperatura deve ser controlada mantendo-se uma curva constante até atingir a temperatura de -32°C , posteriormente as palhetas com os embriões são mergulhadas no nitrogênio líquido (VAJTA E NAGY, 2006).

Já no método de vitrificação, utiliza-se altas concentrações de crioprotetores que formam uma solução viscosa que faz com que a água da célula se solidifique em estado vítreo durante o resfriamento, evitando a formação de cristais de gelo. Contudo, a toxicidade dos crioprotetores é tão alta que as células só podem ficar expostas a essa solução por um período de tempo muito curto ou um volume mínimo de solução (VAJTA ET AL., 1998).

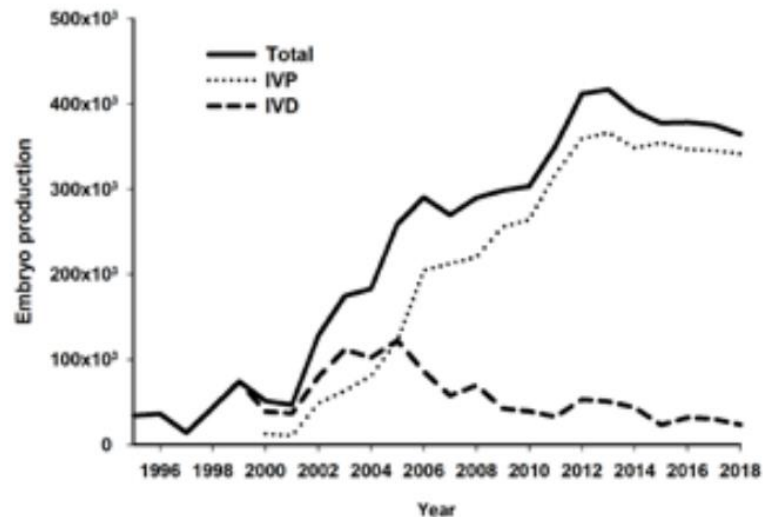
Estudos compararam os dois métodos de criopreservação dos embriões e mostraram que houve efeito na qualidade dos embriões em nível molecular, que causou alteração na expressão de alguns genes, na vitrificação esses efeitos foram menores do que no congelamento clássico (STINSHOFF ET AL., 2011).

3.9 Transferência de Embriões em Tempo Fixo

A técnica de TETF tem ganhado destaque no manejo reprodutivo, pois possui vantagens como maximização da reprodução do rebanho com alto ganho genético e também garante um grande número de nascimento (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

De acordo com o Jornal O Embrião (2019) a partir do ano de 2000 houve um crescimento acelerado do mercado nacional de embriões bovinos (Figura 1). Porém o mercado de embriões ainda não está no seu maior potencial, considerando a importância da pecuária para o país, de acordo com os dados compilados pela SBTE (Figura 2).

Figura 17 - Produção de embriões bovinos no Brasil no período 1996-2018, total e por tecnologia adotada (*in vivo* ou *in vitro*).



Fonte: EMBRAPA (2019).

Figura 18 - Produção de embriões bovinos no Brasil em 2018, estratificada por segmento e por tecnologia adotada (*in vivo* ou *in vitro*).

SEGMENTO	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	TOTAL	Variação 2017-2018
Zebuínos leiteiros	6	15.175	15.181	16,8%
Taurinos leiteiros	17.148	168.897	186.045	-2,0%
Subtotal	17.154	184.072	201.226	-0,8%
Zebuínos de corte	1.017	107.644	108.661	11,5%
Taurinos de corte	5.048	49.867	54.915	-26,9%
Subtotal	6.065	157.511	163.576	-5,3%
Total Geral	23.219	341.583	364.802	-2,8%

Fonte: EMBRAPA (2019).

4 Avaliação e Sincronização das receptoras

As vacas que serão utilizadas como receptoras devem ser bem selecionadas pois qualquer distúrbio no trato reprodutivo pode causar aborto, reabsorção embrionária e partos distócicos, o ideal é a utilização de fêmeas do próprio rebanho, elas podem ser da mesma raça ou de raças diferentes do embrião a ser transferido, devem ter condições reprodutivas adequadas, não apresentar distúrbios de pelve e nutricionais (SCANAVEZ et al., 2013).

A sincronização de cio e ovulação de um grupo determinado de fêmeas permite a estimativa do momento do cio com razoável precisão. O uso de protocolos de sincronização de ovulação e TETF tem colaborado para aumentar as taxas de aproveitamento dos animais tratados (BARUSELLI et al., 2000).

O estagio de desenvolvimento do embrião deve estar sincronizado com o trato reprodutivo da receptora, que se obtém a partir da seleção de receptoras que estavam no cio ao mesmo tempo que a doadora. Para ter resultados considerados ótimos, a receptora deve estar em cio dentro de 12 horas em relação a doadora (HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, 2004).

Um dos métodos mais utilizados para a sincronização do estro em doadoras e receptoras é o protocolo hormonal desenvolvido para Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) que também são utilizados mais recentemente para TETF, os quais utilizam a associação dos hormônios estradiol e progesterona (BÓ, G.A; BARUSELLI, P.S; MAPLETOFT, R.J, 2012).

As receptoras que repetirem cio após a primeira transferência podem ser aproveitadas para as transferências posteriores, porém, aquelas que não confirmarem prenhez na terceira tentativa devem ser descartadas ou substituídas no rebanho (GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F, 2008)

4.1 Inovulação

Os embriões aptos a serem transferidos para as receptoras devem ser os classificados entre 1 e 3 segundo os parâmetros da IETS. O embrião deve ser acomodado no centro de uma palheta contendo meio de cultivo, contendo uma coluna central separada das colunas de cultivo das extremidades por duas colunas de ar. Antes da inovulação, a receptora deve ser avaliada por palpação retal para determinar qual ovário terá o corpo lúteo. Após a identificação do CL, deve-se realizar anestesia epidural baixa para evitar movimentações durante o procedimento. A receptora deve ser higienizada ao redor da vulva, ânus e inserção da calda com água. Após a higienização correta, a palheta que contém o embrião é colocada em um inovulador, revestida por uma bacia estéril e uma camisa sanitária, a fim de evitar contaminações que influenciam nos resultados de taxas de gestação. Em seguida, o inovulador será introduzido via transcervical, na entrada da cérvix se rompe a camisa sanitária e pela manipulação retal deverá ser guiado até o corno uterino ipsilateral do CL cíclico onde o embrião deverá ser depositado (HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B, 2004).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização do estágio supervisionado na ABS Pecplan foi muito importante e de grande enriquecimento na minha formação, tanto pessoal quanto profissional. O acompanhamento das atividades a campo e laboratoriais me proporcionou enormes aprendizados sobre a reprodução animal e suas biotecnologias.

Foi possível conhecer todos os procedimentos da PIVE, realizadas em instalações próprias e modernas, assim como a TETF em diferentes fazendas, com diferentes estruturas, contendo desafios a serem resolvidos nos manejos.

O estágio me propiciou conhecimento prático e agilidade para resolver problemas em momentos de pressão em diferentes ocasiões.

Acompanhou-se os resultados de produção da empresa que mais produz embriões no país, permitindo o entendimento da importância da reprodução animal para o mundo.

Por fim, o estágio e a elaboração deste trabalho contribuíram imensamente para minha formação acadêmica, concluindo com orgulho a graduação no curso de Zootecnia na Universidade Federal de Lavras.

REFERÊNCIAS

ALVES DF, RAUBER LP, RUBIN LF, BERNARDI ML, DEZEN D, SILVA CAM, RUBIN MIB. Desenvolvimento embrionário in vitro de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.40, p.279-286, 2003.

AVELINO, K.B., VANTINI, E., SENEDA, M.M., et al. In vitro production of embryos of cows with acquired infertility. **Theriogenology**, v.57, p.656, 2002.

BALL, P. J.; PETERS, A. R. **Reproduction in cattle**. 3. ed. United Kingdom: Blackwell Publishing, 2004.

BARUSELLI, Pietro S. et al. **Superovulation and embryo transfer in Bos indicus cattle**. **Theriogenology**. São Paulo, p. 77-88. out. 2006.

BARUSELLI, P. S. **Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de reprodução animal, Universidade de São Paulo, 2000.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T.; VALENTIM, R.; BERBER, R.C.A.; CARVALHO FILHO, A.F.; MADUREIRA, E.H.; COSTA NETO W.P. Ovsynch protocol with fixed-time embryo transfer increasing pregnancy rates in bovine recipients. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.1, n.28, p.205, 2000. Suppl.

BENITES, N. R.; BARUSELLI, P. S. Medicamentos empregados para sincronização do crescimento folicular e da ovulação para transferência de embriões. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. N. (Eds.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 329-344.

BÓ, G.A; BARUSELLI, P.S; MAPLETOFT, R.J. **Aumento da taxa de prenhez após sincronização de receptoras de embriões**. Foz do Iguaçu. Anuais, 2012. p. 206-211.

BRACKETT RG, BOUSQUET D, BOICE ML, DONAWICK WJ, EVANS DRESSEL MA. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biol Reprod**, v.27, p.147-158, 1982.

BURATINI, J. Júnior. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.190-196, 2007.

CUNNINGHAM, James G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2. ed. East Lansing: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 34. p. 353-398.

DISKIN, M. G. et al. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 1, p. 345-370, 2003.

DRANSFIELD, M. B. et al. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1874-1882, 1998.

FORTUNE, J. E; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Anim Reprod Sci**, v.82-83, p.109-126, 2004.

GALLI, C., DUCHI, R., CROTTI, G. Et al. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p.599-616, 2003.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM-IVF in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.42, p.371-379, 1996.

GARCIA JM, AVELINO KB, Vantini R. Estado da arte da fertilização in vitro em bovinos. In: I Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina, PR. Anais... **SIRAA: Londrina**, 2004, p.223-230.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2008. p. 222.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H.; VALE, W. G. **Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos: ginecologia**. São Paulo: Varela, 2005.

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ed. Barueri: Manole, 2004. HAFEZ, B.; HAFEZ, E. **Reprodução animal**. Manole: São Paulo, 2004.

HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, p.675-685, 2003.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Bovinos e bubalinos. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (Eds.). **Reprodução Animal**. Barueri. São Paulo: Manole, 2004.

LEAL, L. S. Estudo morfofisiométrico de ovários e maturação ovocitária in vitro em bubalinos e bovinos nas diferentes fases da atividade reprodutiva. 2008. 178 f. Tese (doutorado) - **Universidade Estadual Paulista**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2008.

MORAES, J. C. F. et al. Controle do Estro e Ovulação em Bovinos e Ovinos. In: GONÇALVES, Paulo Bayard Dias. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, p. 25-56. 2002.

NAGAI, T. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v.55, p.1291-1301, 2001.

OLIVEIRA, C.S.; SERAPIÃO, R.V.; QUINTÃO, C.C.R. Biotécnicas da reprodução em bovinos: minicursos ministrados durante o 3º Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em Bovinos” no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica – Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, 52 p. (Embrapa Gado de Leite Documentos, 175). 2014.

REICHENBAC, H. D. et al. Transferência e Criopreservação de Embriões Bovinos. In: RUBIN MIB. Twenty years history of the Brazilian Embryo Technology Society (1985-2005). **Acta Sci Vet**, v.33, p.35-54, 2005.

RUMPF R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. **Rev Bras Zootec**, v.36, p.229-233, 2007.

GONÇALVES, Paulo Bayard Dias. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, p.127 – 178. 2002.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: ROCA, 2008

RODRIGUES, C.F.M., GARCIA, J.M. Fecundação in vitro em bovinos: aplicação comercial. **Arq. Fac. Vet. UFRGS Supl.**, v.28, p.186-187, 2000.

SANGILD, P.T., SCHMIDT, M., JACOBSEN, H., et al. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro produced bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v.62, p.1495-1504, 2000.

SANTOS, Giancarlo Magalhaes dos. **Transferência de embriões**. Viçosa: Cpt, 2012

SARTORI, R. Manejo reprodutivo da fêmea leiteira. **Reprodução animal**, v. 31, n. 2, p. 153-159, 2007.

SCANAVEZ, A. L.; CAMPOS, C. C.; SANTOS, R. M. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 65, n. 3, p. 722-728, 2013.

SENGER, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2. ed. Local: Moscow, Indiana. Current Conceptions, Inc., 2003. p. 284-296.

STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. E. Processos Reprodutivos da Fêmea. In: SWENSON, M. J.; REECE, W., **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. cap. 36, p. 615-644.

STANTON, J. A.; MACGREGOR, A. B.; GREEN, D. P. Gene expression. in the mouse preimplantation embryo. **Reproduction**, v. 125, p. 457- 468, 2003.

Stinshoff H; Wilkening S; Hanstedt A; Bruning K; Wrenzycki C. Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. **Theriogenology**, v.76, p.1433-1441, 2011.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. **IETS**, p. 112-113, Illinois, 1998.

THIBIER M. The 1997 Embryo Transfer Statistics from Around the World. **Embryo Transfer Newsl**, v.16(4), p.24- 28, 1998.

THOMPSON, J.G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.263-275, 2000.

UNAM. Universidad Nacional Autónoma do México. Manejo reproductivo em bovino em sistemas de producción de leche. México: UNAM, 2007.

VAJTA G, HOLM P, KUWAYAMA M, BOOTH PJ, JACOBSEN H, Greve Callesen H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol Reprod Dev**, v.51, p.53-58, 1998.

VAJTA G, NAGY ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reprod Biomed Online**, v.12, p.779-796, 2006.

VIANA JHM, SIQUEIRA LGB, PALHAO MP, CAMARGO LSA. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Anim Reprod**, v.9, p.12-18, 2012.

WALSH, S. W.; WILLIAMS, E. J.; EVANS, A. C. O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 1, p. 127–138, 2011.

WATSON, A. J.; BARCROFT, L. C. Regulation of blastocyst formation. **Front Bioscience**, v. 6, p. 708-730, 2001.

WATSON, A. J.; NATALE, D. R.; BARCROFT, L. C. Molecular regulation of blastocyst formation **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 583-592, 2004.

YOUNG, L.E., SINCLAIR, K.D., WILMUT, I. Large ofspring syndrome in caUle and sheep. **Rev. Reprod.**, v.3, p.155-163, 1998.