



SAMUEL VOLPE SOUZA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO
NA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, CAMPUS
PIRASSUNUNGA E NA EMPRESA PECPLAN ABS COM
FOCO EM BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO ANIMAL**

**LAVRAS – MG
2022**

SAMUEL VOLPE SOUZA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, CAMPUS PIRASSUNUNGA E NA EMPRESA
PECPLAN ABS COM FOCO EM BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO ANIMAL**

Relatório de estágio supervisionado apresentado ao Colegiado do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Medicina Veterinária para obtenção do título de Médico Veterinário.

Prof^a. Dr^a. Nadja Gomes Alves
Orientadora

**LAVRAS – MG
2022**

SAMUEL VOLPE SOUZA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, CAMPUS PIRASSUNUNGA E NA EMPRESA
PECPLAN ABS COM FOCO EM BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO ANIMAL**

Relatório de estágio supervisionado apresentado ao Colegiado do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do curso de Medicina Veterinária para obtenção do título de Médico Veterinário.

APROVADO em 05 de maio de 2022.

Ma. Laís Reis Carvalho, UFLA.

M.V Lorena Lima Firmino, UFLA.

Profa. Dra. Nadja Gomes Alves
Orientadora

**LAVRAS – MG
2022**

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus e minha família, pois sem eles não conseguiria realizar o sonho de um dia concluir o curso de medicina veterinária.

Sou grato a minha orientadora Nadja Gomes Alves pelos ensinamentos, disposição, paciência e suporte durante minha graduação.

Ao professor José Nélio pela oportunidade de ter me proporcionado o contato com a reprodução animal ainda no início da graduação, pelos ensinamentos e oportunidades.

Aos alunos da pós que acompanhei, em especial a Lais Carvalho e Lorena Firmino, que me ajudaram, me deram conselhos e muito aprendizado.

Ao núcleo de estudos NUTRAN e o projeto de extensão que participei durante a graduação, onde consegui aprender muito com palestras, atividades a campo e principalmente o trabalho em equipe.

Aos meus amigos da graduação e da república Santo Gole, que me ajudaram a amadurecer pessoalmente e estavam comigo nos momentos difíceis onde não contava com o apoio direto da família, além das alegrias compartilhadas.

Aos professores, técnicos e funcionários que tive o prazer de ter o contato e aprender durante toda a graduação.

Ao professor Guilherme Pugliesi e toda sua equipe que me proporcionaram uma experiência ótima no meu estágio supervisionado realizado na Universidade de São Paulo, campus Pirassununga, SP e a equipe de técnicos a campo da empresa ABS, Pecplan, onde consegui crescer pessoalmente e profissionalmente.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

O estágio curricular supervisionado foi realizado em duas etapas. A primeira etapa foi no período de 10 de janeiro a 10 de março de 2022 no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM) do setor de reprodução animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, campus Pirassununga, sob supervisão do Prof. Dr. Guilherme Pugliesi. Foram vivenciadas as atividades realizadas no LFEM, onde sua equipe era responsável pelo manejo reprodutivo do rebanho do campus, como inseminação artificial em tempo fixo, diagnóstico de gestação precoce e super precoce por meio de ultrassonografia modo B e modo Doppler, resincronização super precoce, acompanhamento folicular, pesquisas e treinamentos relacionados à reprodução animal. A segunda etapa do estágio foi realizada no período de 21 de março a 15 de abril de 2022 na empresa ABS – Pecplan Importações e Exportações na cidade de Governador Valadares – MG, onde foi possível acompanhar uma rodada de transferência de embriões em tempo fixo (TETF) completa no rebanho das fazendas de gado de leite de toda região. As atividades foram avaliação das receptoras para iniciar o protocolo de TETF, início de protocolo hormonal, aspiração folicular pela técnica *ovum pick up* (OPU), transferência de embriões, diagnóstico de gestação e sexagem por ultrassonografia modo B. No presente relatório será feita a descrição detalhada das rotinas acompanhadas durante as duas etapas do estágio, dando ênfase nos assuntos de maior interesse e estabelecendo um paralelo com o que já se tem relatado na literatura. A vivência da rotina e o acompanhamento da conduta de diferentes médicos veterinários especializados na área da biotecnologia da reprodução animal em bovinos, os quais atuam tanto na pesquisa como na área comercial, foi de suma importância para a formação do senso crítico e aprimoramento das condutas no âmbito pessoal e profissional. A experiência adquirida foi fundamental para a etapa final da graduação e início da vida profissional como médico veterinário.

Palavras-chave: Bovinos, inseminação artificial em tempo fixo, reprodução animal, transferência de embriões em tempo fixo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Curral do “Projetão”.....	11
Figura 2 – Curral do Laboratório de Avaliação Animal e Qualidade da Carne.....	11
Figura 3 – Curral do Departamento de Reprodução Animal.....	12
Figura 4 – Identificação do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular.....	13
Figura 5 – Entrada do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular.....	13
Figura 6 – Ambiente interno do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular.....	14
Figura 7 – Ambiente interno do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular.....	14
Figura 8 – Protocolo para sincronização da ovulação, vacas.....	15
Figura 9 – Protocolo para sincronização da ovulação, novilhas.....	16
Figura 10 – Ressincronização super precoce.....	17
Figura 11 – Animais da estação de monta “Projetão”.....	17
Figura 12 – Manejo reprodutivo estação de monta “Projetão”.....	17
Figura 13 – Manejo de inseminação artificial em tempo fixo realizado nas novilhas do Laboratório de Avaliação Animal e Qualidade da Carne.....	18
Figura 14 – Diagnóstico de gestação da transferência de embriões em tempo fixo em bubalinos.....	20
Figura 15 – Observação de estro nos animais utilizados no estudo.....	21
Figura 16 – Treinamento realizado no Departamento de Reprodução Animal com ultrassonografia modo Doppler.....	22
Figura 17 – (esquerda) corpo lúteo com >25% de vascularização; (direita) corpo lúteo com <25% de vascularização.....	27
Figura 18 – Estrutura montada a campo para o dia da <i>ovum pick up</i>	31
Figura 19 – Laboratório de embriões montado no apartamento.....	32
Figura 20 - Ficha de avaliação de receptoras.....	33
Figura 21 – Avaliação de receptoras e diagnóstico de gestação.....	34
Figura 22 – Protocolo hormonal para sincronização da ovulação na transferência de embriões em tempo fixo utilizado pela empresa ABS.....	35
Figura 23 – Imagem de aspiração dos folículos na semana da <i>ovum pick up</i>	36
Figura 24 – Oócitos selecionados na <i>ovum pick up</i>	37
Figura 25 – (esquerda) Descongelamento do embrião Direct Transfer; (direita) montagem do inovulador para a transferência de embriões em tempo fixo.....	38
Figura 26 – (esquerda) Aplicação da anestesia epidural; (direita) passagem do inovulador no trato reprodutivo da receptora durante a transferência de embriões em tempo fixo.....	38
Figura 27 – Ficha de controle para os animais que receberam a transferência de embriões em tempo fixo e posteriormente passaram pelo diagnóstico de gestação.....	39
Figura 28 – Estrutura montada a campo para montagem dos inovuladores e controle dos animais no dia da transferência de embriões em tempo fixo.....	40
Figura 29 – Sexagem fêmea.....	41
Figura 30 – Sexagem macho.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Porcentagem de vacas gestantes e não gestantes e porcentagem de falsos-positivos do “Projetão”	19
Gráfico 2 – Porcentagem de novilhas gestantes e não gestantes e porcentagem de falsos-positivos do Laboratório de Avaliação Animal e Qualidade da Carne.	19
Gráfico 3 – Área e perfusão sanguínea do corpo lúteo após a inseminação artificial em tempo fixo de vacas gestantes e não gestantes.	26
Gráfico 4 – Porcentagens de oócitos viáveis (graus 1, 2 e 3) e não viáveis coletados na semana da <i>ovum pick up</i>	42
Gráfico 5 – Porcentagens dos oócitos de grau 1, 2 e 3 coletados na semana da <i>ovum pick up</i>	43
Gráfico 6 – Número de animais que receberam o protocolo hormonal e número de transferências de embriões em tempo fixo realizadas	43
Gráfico 7 – Porcentagens de transferências de embriões em tempo fixo realizadas e de animais refugo	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado do diagnóstico de gestação da Transferência de Embriões em Tempo Fixo em bubalinos	20
Tabela 2 – Relação das receptoras avaliadas para iniciar o protocolo hormonal de transferência de embriões em tempo fixo em 66 fazendas assistidas.	42
Tabela 3 – Relação dos oócitos aspirados na semana da <i>ovum pick up</i>	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- BE – Benzoato de estradiol
CE – Cipionato de estradiol
CIV – Cultivo in vitro
CL - Corpo lúteo
DG – Diagnóstico de gestação
DT – Direct transfer
eCG – gonadotrofina coriônica equina
FIV – Fertilização in vitro
FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas
IA – Inseminação artificial
IATF – Inseminação artificial em tempo fixo
LAAQC – Laboratório de Avaliação Animal e Qualidade da Carne.
LFEM – Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular
mg – miligramas
MIV – Maturação in vitro
mL– mililitros
mm – milímetros
OPU – Ovum pick up
P4 – Progesterona
PIVE – Produção in vitro de embrião
TE – Transferência de embriões
TETF – Transferência de embriões em tempo fixo
US – Ultrassom
USP – Universidade de São Paulo
VRA – Departamento de Reprodução Animal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 DESCRIÇÃO DO PERÍODO E LOCAIS DE ESTÁGIO	10
3 DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL FMVZ/USP- CAMPUS PIRASSUNUNGA, SP	10
3.1 Instalações e equipamentos	10
3.2 Descrição das atividades acompanhadas no estágio	14
3.2.1 Estação de monta do campus.....	14
3.2.2 Atividades relacionadas as pesquisas realizadas pela equipe do LFEM	20
3.2.3 Treinamentos realizados no VRA sob supervisão do Prof. Dr. Guilherme Pugliesi e sua equipe	22
4 BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO (IATF, DG DOPPLER E RESSINCRONIZAÇÃO SUPER PRECOCE)	23
4.1 IATF.....	23
4.2 Uso da ultrassonografia doppler em programas de IATF	25
4.3 Ressincronização super precoce.....	28
5 ABS – PECPLAN – GOVERNADOR VALADARES, MG	30
5.1 Instalações e equipamentos	30
5.2 Atividades acompanhadas durante o estágio	32
5.2.1 Avaliação de receptoras e DG da rodada passada de TETF.....	32
5.2.2 Protocolo hormonal para TETF.....	34
5.2.3 Semana da OPU.....	35
5.2.4 Transferência de embriões em tempo fixo	37
5.3 Relação dos animais e fazendas assistidos durante o período de estágio	42
6 BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO (PIVE E TETF)	44
6.1 Produção in vitro de embriões (PIVE)	44
6.2 Transferência de embrião em tempo fixo (TETF)	47
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

As biotecnologias reprodutivas, como inseminação artificial (IA) por detecção de cio ou em tempo fixo (IATF), apresentam um papel importante para melhorar a eficiência produtiva dos rebanhos bovinos se comparadas com a monta natural (BARUSELLI et al., 2018). Apesar do Brasil contar com 218,2 milhões de cabeças de gado (IBGE, 2020), apenas 23% das fêmeas bovinas de corte e leite com idade reprodutiva são inseminadas (ASBIA, 2021). Assim, o Brasil ainda possui um grande potencial para desenvolver a técnica da IA, seja na cadeia produtiva da carne ou do leite.

A IA tem sido utilizada mundialmente e sua aplicação traz grandes benefícios para o rebanho (LIMA et al., 2010). Porém, existem algumas barreiras que dificultam a técnica, como baixa ciclicidade dos animais zebuínos e falha na detecção de estros (BARUSELLI et al., 2004; BÓ et al., 2007). Assim, uma das formas para conseguir vencer essas barreiras foi a criação da IATF, uma técnica que permite realizar a inseminação nos animais sem a necessidade da observação do estro, por meio do uso de protocolos hormonais que induzem o surgimento de uma nova onda folicular, controlam a concentração sanguínea de progesterona e induzem a ovulação em tempo fixo. GnRH, progesterona, benzoato de estradiol, cipionato de estradiol e PGFa são hormônios utilizados nos protocolos. Nesse sentido, 93% das inseminações no Brasil, no ano de 2018, foram realizadas por IATF (BARUSELLI et al., 2022).

Outra estratégia desenvolvida e que vem sendo aperfeiçoada para acelerar o ganho genético e melhorar a produção dos nossos rebanhos é a produção *in vitro* de embriões (PIVE). Nas últimas décadas essa técnica tem se destacado, expandindo notavelmente quando comparada com a produção *in vivo* de embriões (WATANABE et al., 2017). A técnica tem suas variações, porém ela consiste basicamente na aspiração dos folículos ovarianos com pelo menos 2mm (SANTOS et al., 2016) de uma doadora com genética superior, pela técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom ou *ovum pick up* (OPU). Os oócitos recuperados passam pelo processo de maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo do embrião *in vitro* (CIV). Assim, os embriões produzidos são inovulados pela técnica de transferência de embriões em tempo fixo (TETF), respeitando a particularidade de cada embrião (fresco, vitrificado e *direct transfer*), em uma receptora com potencial para manter a gestação.

Partindo disso, o presente trabalho tem como objetivo relatar as rotinas acompanhadas no estágio supervisionado e a importância das biotecnologias reprodutivas IATF e PIVE no cenário da produção animal.

2 DESCRIÇÃO DO PERÍODO E LOCAIS DE ESTÁGIO

O estágio curricular teve carga horária total de 480 horas, sendo realizado em dois locais, no período entre 10 de janeiro a 08 de abril de 2022. A escolha dos locais foi baseada na oportunidade de adquirir o máximo de conhecimento no âmbito da reprodução animal e suas biotecnologias direcionadas a espécie bovina.

Durante o período de 10 de janeiro a 10 de março de 2022 foi realizado o estágio na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus Fernando Costa- Pirassununga - SP, no Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM) do Departamento de Reprodução Animal (VRA) sob a supervisão do Prof. Dr. Guilherme Pugliesi. Foram acompanhadas atividades de pesquisa relacionada a IATF e ressinchronização super precoce. Também, foi possível acompanhar alguns serviços de IATF e ressinchronização super precoce em fazendas comerciais localizadas na região de Pirassununga – SP.

A segunda etapa do estágio foi realizada em Governador Valadares – MG, na empresa ABS – Pec Plan. A rotina foi realizada em fazendas comerciais produtoras de leite na região e as atividades foram desenvolvidas nas áreas de PIVE e TETF.

3 DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL FMVZ/USP- CAMPUS PIRASSUNUNGA, SP

3.1 Instalações e equipamentos

A FZMV conta com um rebanho total de 1.430 cabeças. Na estação de monta 2021/2022, foram utilizadas 447 matrizes, incluindo vacas e novilhas, pertencentes à prefeitura do campus e 95 novilhas do Laboratório de Avaliação Animal e Qualidade da Carne (LAAQC). Além do mais, 10 vacas e 18 novilhas são de uso exclusivo do VRA para pesquisas, aulas práticas e treinamentos da equipe.

O manejo reprodutivo do rebanho foi realizado em dois locais denominados “Projetão” e LAAQC. O “Projetão” é equipado com um curral para manejo das vacas e novilhas da prefeitura do campus, que participaram da estação de monta 2021/2022. Este local (Figura 1), possui um tronco de contenção convencional para bovinos, balança, curral para manejo com apartadores e seringa, além de uma área anexa com uma bancada e pia, cozinha, banheiro, escritório e um almoxarifado. Por fim, foram utilizadas 447 vacas e novilhas, divididas em nove lotes mantidos em pasto *Braquiária decumbens*.

Figura 1– Curral do “Projetão”.



Fonte: Do autor (2022).

O LAAQC conta com 95 novilhas, mantidas em três lotes de acordo com o peso. Cada lote fica em um piquete com 4 cochos automáticos que calculam o consumo, onde apenas um animal tem acesso por vez ao cocho, e as novilhas ficam no sistema de confinamento a base de silagem de milho. O manejo reprodutivo dos animais é realizado em um curral construído com ferragens e que possui uma seringa, tronco de contenção convencional, balança, almoxarifado, além de uma bancada com pia (Figura 2). O local também possui baias individuais para algumas novilhas.

Figura 2 – Curral do Laboratório de Avaliação Animal e Qualidade da Carne.



Fonte: Do autor (2022).

Já no perímetro do VRA há um curral de manejo equipado com porteiras de apartação, tronco de contenção convencional e mais seis troncos de contenção em ferro para manejo dos animais destinados à pesquisa, treinamento e aula prática do LFEM, além dos demais

laboratórios presentes no VRA. O espaço também possui uma bancada com pia e é todo coberto, como apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Curral do Departamento de Reprodução Animal.



Fonte: Do autor (2022).

O VRA possui uma estrutura completa de cozinha, sala de professores, anfiteatro e diversos laboratórios relacionados à reprodução animal. Um dos laboratórios é o LFEM, que possui dois ambientes, sendo um deles reservado para cultivo celular. O LFEM é equipado com quatro equipamentos de ultrassom (US), três botijões de nitrogênio líquido para armazenamento de sêmen, uma centrífuga com capacidade para 80 tubos de 15mL cada, micro centrífuga, bancada, pipetas, dois freezers -20°C , dois freezers -80°C , duas geladeiras, filtro de água miliQ e destilada, fluxo unidirecional horizontal, estufa, banho seco, banho maria, máquina de RT PCR, pHmetro, balança de precisão, agitador magnético, leitora de absorbância, lavadora de placas, Nanovue, speed vacum, computador e TV. Laboratório é apresentado nas figuras 4,5,6 e 7.

Figura 4 – Identificação do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 5 – Entrada ao Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 6 – Ambiente interno do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 7 – Ambiente interno do Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular.



Fonte: Do autor (2022).

3.2 Descrição das atividades acompanhadas no estágio

Durante o período de estágio foi possível acompanhar a rotina completa dos alunos da pós-graduação, que fazem parte da equipe do LFEM, coordenada pelo professor Guilherme Pugliesi. Assim, houve participação ativa na estação de monta, bem como em treinamentos, em duas pesquisas e em visitas a fazendas comerciais.

3.2.1 Estação de monta do campus

A estação de monta teve início no dia 15 de novembro de 2021 e término no dia 15 de fevereiro de 2022. Os manejos reprodutivos do rebanho da universidade eram concentrados principalmente no período da manhã e à tarde eram realizados os treinamentos da equipe, as

atividades de pesquisas ou uma eventual visita em fazendas comerciais. Foi utilizado protocolo de IATF com três manejos dos animais, que visam cumprir três premissas bases para o sucesso da técnica: induzir a emergência de uma nova onda folicular, controlar a concentração sanguínea de progesterona (P_4) durante o protocolo e, em seguida, sincronizar a indução da ovulação (Bó et al., 2013). Para os animais de uma cria ou mais, os três manejos eram realizados da seguinte forma, representado também na figura 8:

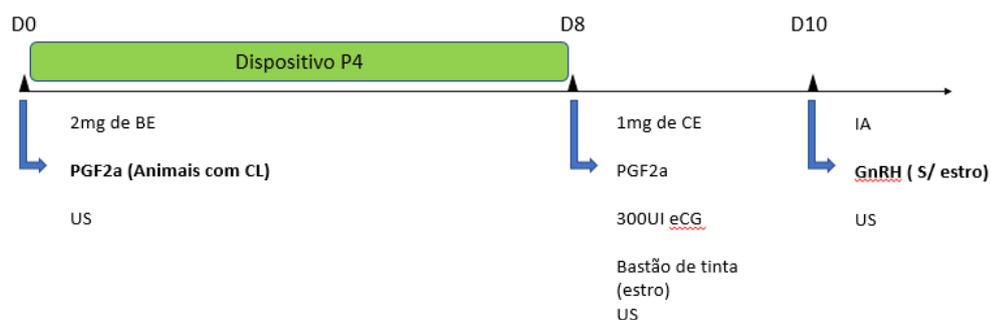
Dia 0 = administração de 2mg de benzoato de estradiol (BE) + dispositivo intravaginal 1g de P_4 de primeiro ou segundo uso + 500 microgramas de d-cloprostenol nos animais que apresentavam CL; garantir a sincronização de uma nova onda.

Dia 8 = retirada do dispositivo + administração de 300 UI de eCG + 1mg de cipionato de estradiol (CE) + 500 microgramas de d-cloprostenol + bastão de cio; controlar a P_4 durante o protocolo e sincronizar a ovulação.

Dia 10 = inseminação artificial + administração de GNRH (10,5 microgramas de acetato busarelina) nos animais que não demonstraram estro.

Em todos os dias de manejo era realizado o acompanhamento dos ovários por meio de ultrassonografia transretal.

Figura 8 – Protocolo para sincronização da ovulação, vacas.



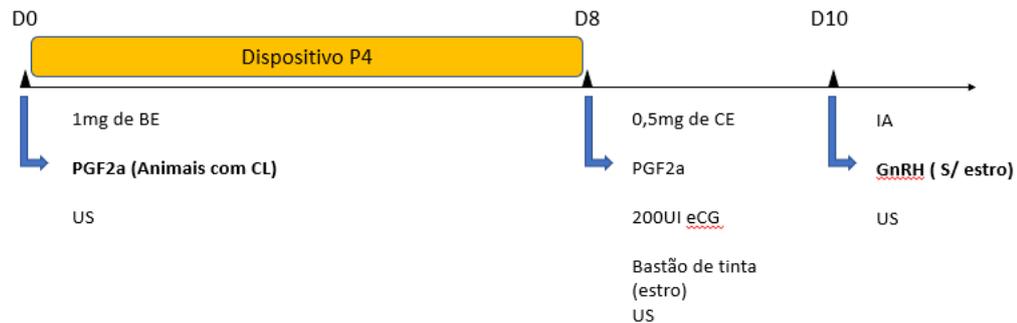
Fonte: Do autor (2022).

Nas novilhas, representado na figura 9, a dose de alguns hormônios utilizados era reduzida, visto que segundo Giroto et al. (2016) tal dosagem em novilhas já é suficiente para trazer os mesmos resultados na IATF, sendo elas:

D0 = 1mg de BE + dispositivo intravaginal 1g de P_4 de segundo ou terceiro uso + 500 microgramas de d-cloprostenol nas novilhas que apresentavam CL;

D8 = retirada do dispositivo intravaginal 1g de P₄ de segundo ou terceiro uso + 200 UI de eCG + 0,5mg de CE + 500 microgramas de d-cloprostenol.

Figura 9 – Protocolo para sincronização da ovulação, novilhas.

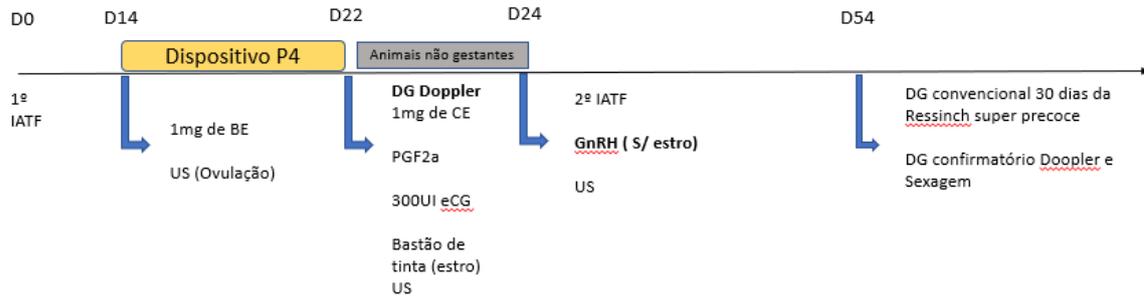


Fonte: Do autor (2022).

Após a primeira IATF foi realizada a resincronização super precoce, como representado na figura 10, que consiste na inserção do implante de P₄ e 1mg de BE 14 dias após a inseminação (GUIMARÃES et al., 2022). No dia 22 é realizado o diagnóstico doppler e os animais que apresentarem CL com perfusão sanguínea >25% (PUGLIESI et al. 2014b) na sua maior área são consideradas gestantes (até 10% de falso positivo). Logo, esses animais não recebem mais aplicações hormonais. Os demais animais do lote que são diagnosticados como não gestantes recebem a continuação do protocolo de IATF, com administração de 1mg de CE associado a PGF_{2a} e 300UI de eCG. A segunda inseminação dos animais trabalhados ocorre 2 dias depois, ou seja, dia 24 após a primeira IATF (GUIMARÃES et al., 2022).

O diagnóstico gestacional da segunda IATF foi realizado 30 dias depois no modo B do US, juntamente com o DG confirmatório e a sexagem fetal nas vacas que foram diagnosticadas prenhas no DG doppler. Ademais, animais que estavam vazios nesses 2 serviços foram soltos com touros para, posteriormente, realizar o DG final da estação de monta do campus. A figura 11 apresenta os animais utilizados no curral do “projêto” e as figuras 12 e 13 representam alguns dos manejos realizados durante o estágio.

Figura 10 – Ressincronização super precoce.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 11 – Animais da estação de monta “Projetão”.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 12 – Manejo reprodutivo estação de monta “Projetão”.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 13 – Manejo de inseminação artificial em tempo fixo realizado nas novilhas do Laboratório de Avaliação Animal e Qualidade da Carne.



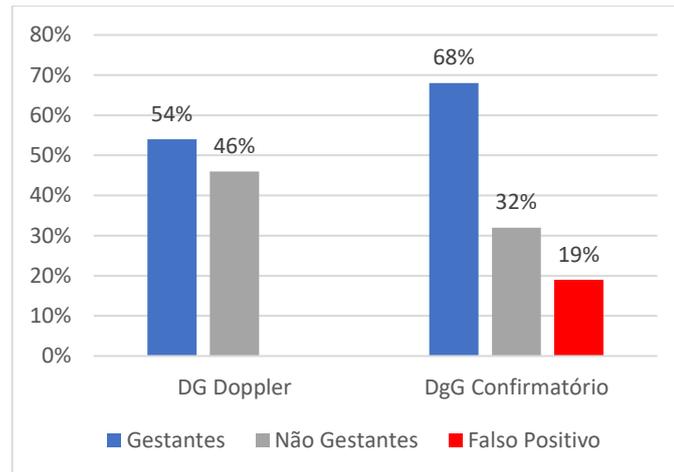
Fonte: Do autor (2022).

No âmbito das planilhas para o controle dos animais da estação de monta, a equipe do LFEM identifica o animal, descreve a situação deles (gestante ou não gestante) e realiza o escore de ovário das vacas vazias, conforme abaixo:

- 1 = animais sem folículo dominante em um dos ovários
- 2 = animais com folículo dominante em um dos ovários
- 3 = animais com CL em um dos ovários

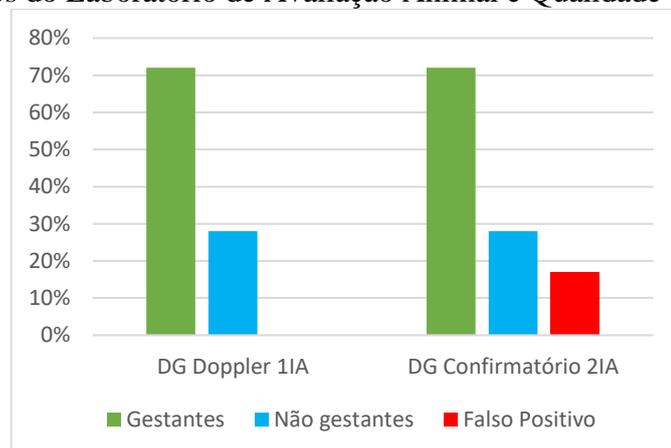
O diagnóstico de gestação dos animais trabalhados na estação de monta é apresentado nos gráficos 1 e 2.

Gráfico 1 – Porcentagem de vacas gestantes e não gestantes e porcentagem de falsos-positivos do “Projetão”



Fonte: Do autor (2022).

Gráfico 2 – Porcentagem de novilhas gestantes e não gestantes e porcentagem de falsos-positivos do Laboratório de Avaliação Animal e Qualidade da Carne.



Fonte: Do autor (2022).

Além das vacas e novilhas acompanhadas, realizou-se o DG em búfalas que foram submetidas à TETF. Os resultados e o manejo são apresentados respectivamente na tabela 1 e na figura 14.

Tabela 1 – Resultado do diagnóstico de gestação da Transferência de Embriões em Tempo Fixo em bubalinos

	Número de animais	% de animais gestantes
Gestantes	4	18%
Não Gestantes	18	82%
Total	22	100%

Fonte: Do autor (2022).

Figura 14 – Diagnóstico de gestação da transferência de embriões em tempo fixo em bubalinos.



Fonte: Do autor (2022).

3.2.2 Atividades relacionadas as pesquisas realizadas pela equipe do LFEM

A primeira pesquisa acompanhada tinha como objetivo avaliar os efeitos da antecipação do desmame (150 dias vs. 240 dias) das crias de vacas Nelore no desempenho reprodutivo das

matrizes, desempenho ponderal das bezerras desmamadas e das bezerras da próxima estação de monta que passaram pela programação fetal. Assim, além das atividades relacionados ao manejo reprodutivo da estação de monta, que também estavam incluídos no estudo, foi possível participar de:

- Coleta de sangue da jugular e processamento para obtenção do plasma;
- Biopsia de fígado e do músculo trapézio de uma amostra representativa das bezerras e dos bezerros, respectivamente, nascidos na última estação de parição.

A segunda pesquisa que ainda era um piloto, tinha o objetivo de avaliar o efeito da dose de BE administrado 12 dias após a IA em novilhas inseminadas. Participaram da pesquisa 15 novilhas Nelore que receberam 500 microgramas de cloprostenol sódico + implante de P₄, e 7 dias depois receberam o detector de cio EstroTECT®. As novilhas eram observadas por alguém da equipe duas vezes ao dia, como representado na figura 15, sendo 40 minutos na parte da manhã e 40 minutos na parte da tarde, e as que apresentavam cio eram inseminadas no sistema am:pm.

Figura 15 – Observação de estro nos animais utilizados no estudo.



Fonte: Do autor (2022).

3.2.3 Treinamentos realizados no VRA sob supervisão do Prof. Dr. Guilherme Pugliesi e sua equipe

- Avaliação da perfusão sanguínea do CL pelo US modo Doppler; treinamento representado na figura 16.
- Avaliação do trato reprodutivo por palpação retal e US;
- Passagem de aplicador para inseminação em vacas e novilhas;

Figura 16 – Treinamento realizado no Departamento de Reprodução Animal com ultrassonografia modo Doppler.



Fonte: Do autor (2022).

Como estagiário, tive liberdade e responsabilidade para realizar quase todas as etapas do manejo reprodutivo da estação de monta e das pesquisas, sendo as etapas que realizei descritas abaixo:

- Administração de hormônios,
- Marcação com bastão para identificação de cio,
- Manejo no tronco de contenção,
- Avaliação ginecológica pelo US,
- IATF,
- DG doppler com 22 dias,
- DG com US modo B aos 30 dias após a segunda IA do US modo B,

- Sexagem fetal,
- Coleta de sangue e processamento do mesmo no laboratório,
- Observação de cio.

Durante o estágio também pude acompanhar visitas a fazendas comerciais para realização do protocolo de IATF e ressincronização super precoce em vacas e novilhas de corte da raça Nelore.

4 BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO (IATF, DG DOPPLER E RESSINCRONIZAÇÃO SUPER PRECOCE)

4.1 IATF

Com o avanço da produção de proteína animal no nosso país, o Brasil tem uma importante posição para a indústria de carne mundial, destacando-se também no mercado das exportações. Nesse contexto, tornou-se fundamental garantir uma melhor performance reprodutiva e, conseqüentemente, maior eficiência econômica e produtiva de rebanho. Assim, as biotecnologias da reprodução conquistaram seu espaço na nossa pecuária.

Tendo isso em vista, a IA por detecção do estro foi uma estratégia que surgiu apresentando grandes avanços em relação à monta natural, como maior ganho genético, resultando em progênes superiores (LAMB; MERCADANTE, 2016), menor incidência de distocia no parto e um maior controle das doenças transmitidas sexualmente (VISHWANATH, 2003). No entanto, apesar dos avanços citados, a técnica apresenta dois principais problemas que dificultavam a sua execução, como o anestro pós-parto e a falha na detecção de estro (BÓ et al., 2007). Essas dificuldades são agravadas quando se trata de animais *Bos indicus*, pois apresentam estro de menor duração do que os *Bos taurus* (FIGUEIREDO et al., 1997) ou do que de vacas leiteiras de alta produção, que não possuem uma boa performance reprodutiva e detecção de estro devido a sua alta produção de leite, parâmetros que estão inversamente correlacionados (WILTBANK et al., 2006).

Com o objetivo de solucionar os problemas relacionados com a IA, surgiu a IATF, estratégia que permitiu aos animais saírem do anestro pós-parto mais cedo e serem inseminados sem a necessidade da detecção de estro. Para conseguir esse feito, diferentes estudos proporcionaram a elaboração de protocolos a base de GNRH ou de ésteres de estradiol e, apesar de cada protocolo ter sua particularidade para categoria e/ou sistema a ser trabalhado, todos eles possuem três premissas em comum para garantir o seu sucesso na concepção, sendo:

- 1- Nova emergência da onda folicular;
- 2- Controle da concentração sanguínea de progesterona durante o protocolo;
- 3- Induzir a ovulação sincronizada;

O protocolo a base de GnRH mais utilizado foi designado de Ovsynch por Pursley et al. (1995), e consiste na administração de GnRH no primeiro dia, permitindo a emergência de uma nova onda folicular pela indução da ovulação, seguida da administração de PGF_{2α} sete dias depois para lisar o CL e controlar a concentração sanguínea de progesterona. Uma segunda administração de GnRH é feita 48 h após a aplicação de PGF_{2α} e a IA acontece 16h após a segunda aplicação do GnRH.

Nessa perspectiva, o Ovsynch é mais utilizado em vacas de leite de alta produção (WILTBANK et al., 2011), e é necessário realizar uma pré-sincronização para que o animal esteja em uma fase do ciclo estral mais responsiva ao primeiro GnRH do protocolo (CHEBEL AND SANTOS, 2010), ocasionando, assim, melhores resultados para o Ovsynch (WILTBANK et al., 2011). É importante salientar que tal protocolo para vacas zebu lactantes, mantidas em pastos tropical, apresenta baixa eficiência, pois tal condição está associada à alta incidência de anestro pós-parto (BARUSELLI et al., 2002).

O protocolo a base de ésteres de estradiol mais utilizado tem duração entre 9 e 11 dias e consiste na administração intramuscular de 2mg de BE associada a inserção do dispositivo de liberação lenta de P4 no dia zero (D0 - dia do início do protocolo), com objetivo de sincronizar a emergência de uma nova onda folicular no animal em qualquer estágio do ciclo estral (BÓ et al., 2002). Tendo isso em vista, o dispositivo de P4 exógena intravaginal permanece no animal por 7, 8 ou 9 dias (BARUSELLI et al., 2004) e, no momento da sua retirada, é administrada uma dose de PGF_{2α} para permitir o controle da concentração sanguínea de P₄, combinado a uma dose de eCG, com a função de dar suporte ao LH para o crescimento final do folículo dominante, principalmente em animais com menor escore e/ou fêmeas em condição de pós-parto (PESSOA et al., 2016). Além disso, ainda no momento da retirada do dispositivo, é administrado 1mg de CE para induzir a ovulação sincronizada (Sales et al., 2012) e 48h após é realizada a IATF.

Segundo Monteiro et al. (2015), em 25% das vacas com alta produção de leite a administração de BE mais inserção do dispositivo de P4 intravaginal não sincroniza uma nova emergência de onda folicular, com isso, estas vacas chegam ao final do protocolo com um folículo persistente de menor fertilidade (MELO et al., 2018). Nesse sentido, houve uma adaptação do protocolo a base de ésteres de estradiol mais P4 com uma combinação da

administração de GnRH no D0, diminuindo o número de vacas com folículo persistente no momento da indução a ovulação.

Essa estratégia é interessante pelo fato de o GnRH ovular um possível folículo e aumentar a P₄ no início do protocolo, fator que aumenta a fertilidade em vacas leiteiras de alta produção, submetidas ao protocolo de IATF (BISINOTTO et al., 2015). Por outro lado, quando se trata de gado de corte, a administração de PGF_{2α} no início do protocolo (dia 0) pode trazer melhores resultados na concepção pelo fato de ocorrer a luteólise em animais com CL responsivos à PGF_{2α}, baixando, assim, a concentração sérica de P₄ durante o protocolo (CARVALHÃES et al, 2016).

Outra estratégia também utilizada para rebanho leiteiro de alta produção é a administração de uma segunda dose de PGF_{2α}, visto que ela permite uma maior taxa de luteólise para as vacas com CL, diminuindo a P₄ no momento do proestro e estro do animal e, com isso, provocando aumento na taxa de prenhez por IA (WILTBANK., 2015).

4.2 Uso da ultrassonografia doppler em programas de IATF

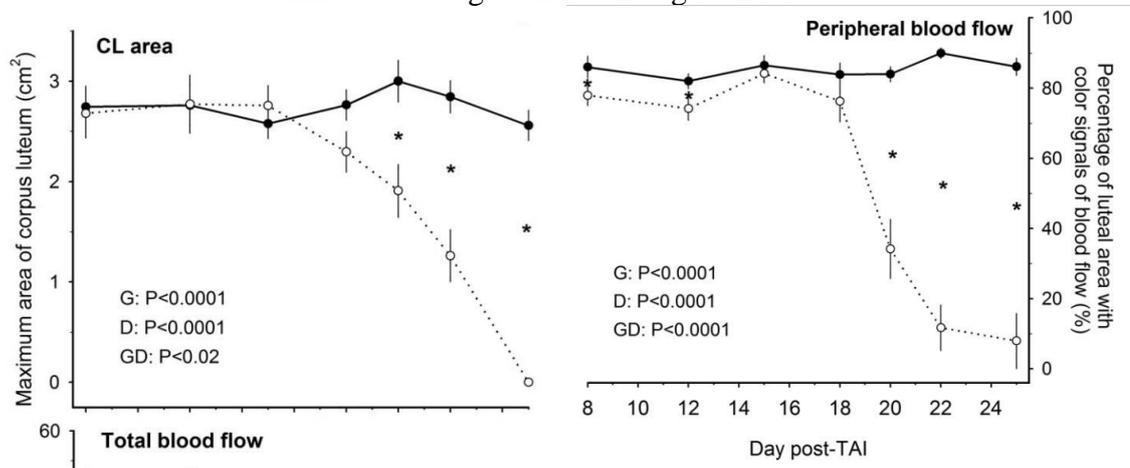
O diagnóstico de gestação por meio da ultrassonografia foi um dos avanços tecnológicos no campo da pesquisa e comercial, uma vez que tornou-se mais preciso e precoce o DG se comparado com a palpação transretal. O ultrassom convencional no modo brilho (B, escala de cinza) proporciona uma imagem bidimensional da estrutura a ser avaliada e permite a avaliação das imagens para diversos fins, como acompanhamento da dinâmica folicular, diagnóstico de gestação, avaliação de possíveis patologias no trato reprodutivo das fêmeas e viabilidade embrionária e fetal (GINTHER, 1995).

Um dos vários fatores que garante o sucesso de uma gestação bem estabelecida é a manutenção do CL funcional mesmo após o período da luteólise, período esse que ocorre em gado de corte zebu entre os dias 15-18 após a ovulação (PUGLIESI et al., 2014b), representado no gráfico 3. Nesse cenário, o Interferon-t (IFN-t), é uma glicoproteína secretada pelo concepto e, quando presente, inibe a pulsatilidade de secreção da PGF_{2α} pelo endométrio, impedindo, dessa forma, a luteólise. Além do mais, permite a secreção de P₄ pela sobrevivência do CL e a manutenção da prenhez (SPENCER et al., 2007).

Atualmente, o método mais usado para realizar o diagnóstico da gestação nos rebanhos bovinos é baseado na visualização da viabilidade embrionária pelo US transretal modo B, entre os dias 28 e 35 após a inseminação (FRICKE et al., 2002). Essa técnica é relativamente atrasada se tomar como base o reconhecimento materno, que ocorre próximo ao período crítico da

luteólise (Thatcher et al., 1995). Nesse sentido, é relevante diagnosticar a gestação o mais cedo possível para diminuir o intervalo de inseminações nas vacas não prenhes e, assim, conseguir uma melhor eficiência reprodutiva do rebanho a ser trabalhado (FRIEDRICH et al., 2010). Com isso, alguns autores propuseram o uso da ultrassonografia modo Doppler como uma técnica para diagnosticar precocemente a gestação (QUINTELA et al., 2012). Assim, a ultrassonografia Doppler começou a ser utilizada para conseguir identificar os animais não gestantes de forma precoce pela detecção do CL afuncional, baseado na redução do tamanho luteal e do fluxo sanguíneo (PUGLIESI et al., 2013).

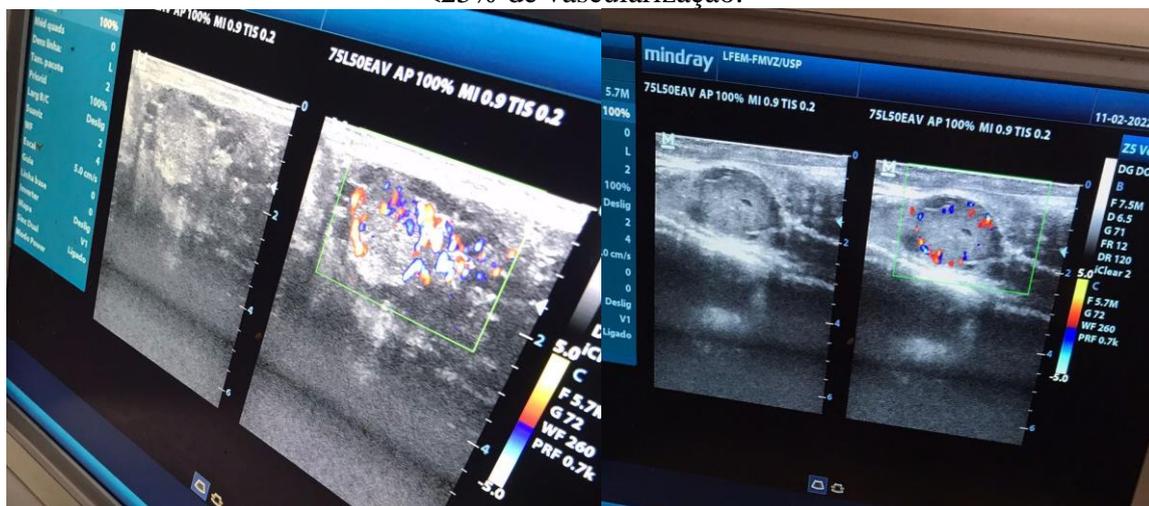
Gráfico 3 – Área e perfusão sanguínea do corpo lúteo após a inseminação artificial em tempo fixo de vacas gestantes e não gestantes.



Fonte: Pugliesi et al (2014b).

Área do CL(cm²) e fluxo sanguíneo periférico, medido pela porcentagem de sinais coloridos na área luteal do CL com a ultrassonografia modo Doppler de vacas gestantes e não gestantes ao longo dos dias após a IATF.

Figura 17 – (esquerda) corpo lúteo com >25% de vascularização; (direita) corpo lúteo com <25% de vascularização.



Fonte: Do autor (2022).

Subsequente, baseado nas informações já presentes na literatura, Siqueira et al. (2013) e Pugliesi et al. (2014b) avaliaram a acurácia do DG pelo modo doppler em vacas de leite e de corte, respectivamente, aos 20 dias após a inseminação. No estudo de Siqueira et al. (2013), foram observados alta acurácia e quase 100% de sensibilidade usando apenas a vascularização do CL como parâmetro para diagnosticar a gestação. Já no gado de corte, Pugliesi et al. (2014b) observaram 100% de sensibilidade e 91% de acurácia quando combinaram o tamanho com a perfusão sanguínea do CL. Com essas pesquisas, pode-se inferir que a ultrassonografia doppler é uma ferramenta acurada para diagnosticar precocemente a gestação, devido a sua baixa possibilidade de diagnosticar um animal gestante como não gestante (0% de falso-negativo). Dessa forma, esse ponto é fundamental para a técnica ser aplicável em campo, pois uma perda econômica, por um possível resultado falso-negativo, pode impactar de forma a sobrepor os ganhos obtidos pelo uso da ultrassonografia modo doppler.

Os critérios de avaliação utilizados nos estudos para determinar um CL afuncional ou em regressão nas vacas não gestantes baseiam-se principalmente na menor vascularização apresentada pela ultrassonografia doppler (SIQUEIRA et al., 2013; PUGLIESI et al; 2014b). Alguns critérios, por sua vez, apresentam certa diferença na interpretação, por exemplo, Siqueira et al. (2013) consideraram que as vacas vazias após a inseminação seriam aquelas que não demonstrassem sinais coloridos indicativos de fluxo sanguíneo na região central do CL. Já nas vacas de corte, Pugliesi et al. (2014b) determinaram que o animal considerado não gestante era aquele que apresentava sinais coloridos indicando fluxo sanguíneo < 25%, na região central do CL. Na Figura 17 pode-se notar a diferença apresentada de um animal gestante para um não

gestante seguindo os critérios de avaliação da funcionalidade do CL, de acordo com Pugliesi et al. (2014).

Apesar da técnica ser acurada e adiantar significativamente o DG, de 30 para 22 dias após a inseminação, é importante considerar o risco de resultados falso positivos, ou seja, animais considerados gestantes, mas que no DG convencional no dia 30 após a IATF não estão gestantes. Esses resultados que levam a um CL funcional no dia do diagnóstico precoce podem estar relacionados a fatores como um animal com ciclo estral mais longo (>22dias) e ovulação mais tardia no protocolo de IATF. Porém, grande parte também pode estar relacionada com a perda embrionária entre o diagnóstico precoce no modo doppler (Dias 20-22) e a confirmação pelo DG convencional (Dia 30), visto que este período de 8-10 dias de intervalo entre os dois pode apresentar maiores perdas embrionárias (DISKIN et al., 2008).

Portanto, essas perdas embrionárias no período citado podem ter impactado na menor acurácia observada em vacas leiteiras de alta produção (SIQUEIRA et al., 2013) se comparadas com vacas nelores de corte (PUGLIESI et al., 2014b), uma vez que vacas especializadas para produção de leite possuem um índice de mortalidade embrionária de 2 a 4 vezes maior (FRICKE et al., 1998).

4.3 Ressincronização super precoce

O uso de programas para ressincronização da ovulação permite uma consolidação da IATF nos rebanhos de corte, acelerando o ganho genético obtidos da IA e reduzindo a necessidade de touros reprodutores na fazenda (BARUSELLI et al., 2017). Além disso, os programas de ressincronização resultam em maiores taxas de concepção no final da estação de monta do que uma IATF seguida de monta natural em gado de corte (CREPALDI et al., 2017). Tais resultados são causados muitas vezes pelo grande número de vacas zebu que não ficaram gestantes e também retornam para a condição de anestro após a primeira IATF (ALVES et al., 2021), condição essa que ocorre principalmente em animais com baixa condição de escore corporal (AYRES et al., 2009). Portanto, usando os programas de ressincronização da ovulação, estes animais têm uma segunda chance de retomar a atividade ovariana após o parto.

Em estudos iniciais, a ressincronização foi realizada no momento do DG convencional, entre 28 e 32 dias depois da IATF (BÓ et al., 2016). As vacas diagnosticadas como não gestantes eram imediatamente submetidas à ressincronização, sendo esse programa flexível e com maior aproveitamento dos hormônios, pois existe uma janela de tempo para realizar o DG, e apenas os animais não gestantes recebem o tratamento. Entretanto, o intervalo de

inseminações pode ultrapassar 38 dias, o que é considerado um tempo excessivo se comparado com a exposição ao touro, em que as montas ocorrem por volta dos 21 dias após a primeira IATF nas vacas que retornam ao estro natural. Contudo, a taxa de serviço na monta natural para os animais que retornam ao estro aproximadamente 21 dias após a IA é por volta de 50% (SÁ FILHO et al., 2014). Assim, mesmo com esse maior intervalo de inseminações promovido pela ressincronização convencional, a técnica apresenta benefício, pois diminui a duração da estação de monta e garante 100% de taxa de serviço.

Nesse contexto, para otimizar o intervalo de inseminações nos programas de ressincronização, foi desenvolvido a ressincronização precoce (RE22), na qual o protocolo se inicia 22 dias após a primeira IATF, ou seja, 8 dias antes do DG convencional pelo ultrassom modo B (SÁ FILHO et al., 2014). Os primeiros tratamentos, que consistem na inserção do dispositivo intravaginal de P₄ e administração de estradiol, são realizados nas vacas gestantes e não gestantes no dia 22 após a IATF. O uso de 2 mg de BE em vacas que se encontram gestantes nesse período não afetou a concepção (SÁ FILHO et al., 2014). No dia 30 é realizado o DG e a continuação do protocolo de IATF nos animais que foram diagnosticados como não gestantes e, dessa forma, o intervalo de inseminações diminui para 32 dias. A adesão à ressincronização precoce (RE22) é mais difícil por parte dos produtores, pois o tratamento é iniciado em animais gestantes e não gestantes, e também pelo fato do DG não ser flexível, dificultando, assim, para a fazenda encaixar o manejo reprodutivo na sua rotina.

Em determinado momento, tornou-se possível identificar com alta acurácia as fêmeas não gestantes com 22 dias após a IATF, por meio da avaliação da funcionalidade do CL pela ultrassonografia color-doppler (SIQUEIRA et al., 2013; PUGLIESI et al., 2014b). Dessa forma, surgiu o programa de ressincronização super precoce, que consiste em iniciar o protocolo 14 dias após a IATF e 8 dias depois, ou seja, 22 dias após a IATF, realizar o DG utilizando a ultrassonografia doppler.

Nessa perspectiva, os animais diagnosticados como não gestantes continuam no protocolo e dois dias depois é realizada a segunda IATF, diminuindo para 24 dias o intervalo de inseminações. Tal redução é tão significativa que está próximo à capacidade do touro cobrir uma vaca que retorna ao estro aproximadamente 21 dias após a IA encurtando ainda mais a estação de monta e aumentando a eficiência reprodutiva da fazenda (OJEDA-ROJAS et al., 2021). Contudo, é importante ressaltar que os tratamentos hormonais deste programa se iniciam antes do reconhecimento materno da gestação (BINELLI et al., 2001), gerando uma

preocupação, pois para o surgimento da emergência de uma nova onda, o mais utilizado nos países da América do Sul é a combinação de P₄ e BE.

Nesse viés, sabe-se que o E₂ tem o efeito luteolítico pela indução de pulsos de PGF_{2α} pelo endométrio (PUGLIESI et al., 2012). Contudo, segundo Guimarães et al. (2022) há um efeito dose dependente, sendo que para a utilização de BE no dia 14 após a primeira IATF no programa de ressincronização super precoce deve ser utilizada a dose de 1mg, visto que esta dose se mostrou suficiente para sincronizar uma nova emergência de onda folicular, sem comprometer os resultados da concepção em vacas de corte. Em adição, novilhas de corte que receberam 1mg de BE associada a inserção do dispositivo intravaginal de P₄ no dia 14 após a IATF, não apresentaram menor taxa de concepção (MOTTA et al., 2020).

5 ABS – PECPLAN – GOVERNADOR VALADARES, MG

No período de 21/03/2022 até 15/04/2022 foi realizado o estágio na empresa Pecplan ABS Importação e Exportação Ltda, em Governador Valadares – MG, sob supervisão da equipe de técnicos a campo que realizam atividades de OPU e Transferência de Embriões em Tempo Fixo (TETF) para produtores de leite da região.

Atualmente, em sociedade com a Cooperativa Agropecuária Vale do Rio Doce, a ABS presta assistência para 120 fazendas cooperadas, produtoras de leite. Com isso, a empresa leva o avanço genético proporcionado pela biotecnologia aos produtores cooperados e também para eventuais propriedades não cooperadas que queiram adotar a atividade em sua fazenda.

5.1 Instalações e equipamentos

A empresa possui um alojamento na cidade de Governador Valadares – MG, onde ficam hospedados os técnicos que trabalham a campo e os estagiários da região e/ou de outras regiões que trabalham em períodos determinados, como na semana da OPU, por exemplo. No alojamento, fica armazenado todo o material para uso no DG e avaliação de receptoras, início de protocolo para sincronização de receptoras e TETF, como ultrassom, descongelador de sêmen e embrião, inovuladores, caixas térmicas para transporte dos equipamentos, botijões de nitrogênio líquido para armazenamento dos embriões congelados, seringas, agulhas, pistola de vacinação e hormônios que serão utilizados nos protocolos.

Durante a OPU, a equipe transportava para o campo todo material necessário para a aspiração das doadoras e manejo dos oócitos, na própria propriedade assistida, como mostrado na figura 18. Nesse sentido, foram considerados materiais para aspiração OPU: mesa, luva de palpação e procedimento, ultrassom, guia de aspiração folicular, probe microconvexa, tubo Falcon, cateter, bomba de vácuo, aquecedor de bolso com bateria, lidocaína 2%, camisinha para aspiração folicular, filtro para bomba de vácuo, sistema de aspiração folicular com rolha de alumínio, agulhas e seringas. Os materiais para seleção de oócitos e maturação incluíram: lupa, meio MIV, filtros, transportadora de oócitos, pipetas, meio para lavagem do líquido folicular e oócitos, placas e tubos para armazenagem dos oócitos na transportadora.

Figura 18 – Estrutura montada a campo para o dia da *ovum pick up*.



Fonte: Do autor (2022).

Para a TETF, os equipamentos foram levados a campo e de acordo com o tipo de embrião a ser transferido (a fresco, vitrificado ou direct transfer - DT). Os equipamentos da TETF em comum para os três tipos de embriões consistiam no pano de campo, inovuladores, álcool, seringas, agulhas, lidocaína 2%, camisinhas de transferência de embriões (TE), bainhas de TE e ficha controle.

Os embriões a fresco e vitrificados foram levados a campo em transportadora, já os embriões DT ficavam armazenados em botijões de nitrogênio líquido e eram descongelados em descongeladores de sêmen e/ou embrião.

O laboratório para envazar os embriões era montado no apartamento em um quarto higienizado anteriormente e restrito, onde apenas os técnicos da respectiva semana em que se

realizava as TETF tinham acesso. O laboratório contava com uma estrutura completa para desvitrificação, avaliação e envasamento de embriões, representado na Figura 19.

Figura 19 – Laboratório de embriões montado no apartamento.



Fonte: Do autor (2022).

5.2 Atividades acompanhadas durante o estágio

5.2.1 Avaliação de receptoras e DG da rodada passada de TETF

Durante o período de estágio, foi possível acompanhar o processo que envolve a rotina de TETF da empresa. Nesse viés, a rotina consiste no DG por ultrassonografia transretal, com no mínimo 23 dias da inovulação da rodada anterior de TETF; 23 dias pois os embriões são inovulados com 7 dias após sua fertilização. O controle dos animais diagnosticados era feito em ficha utilizada na TETF (Figura 27). Junto com o DG, também foi realizada a avaliação das receptoras que seriam candidatas a receberem a próxima rodada de TETF, tabela 2. As anotações dos receptores foram realizadas em ficha específica contendo identificação do animal, raça, categoria (novilha, vaca lactante, vaca parida e vaca solteira), e seu ECC (Figura 20), os demais espaços eram preenchidos de acordo com as visitas dos manejos seguintes.

Figura 20 - Ficha de avaliação de receptoras.

RECEPTORA		Ficha de Sincronização TETF - Projeto: Cooperativa Agropecuária Vale Do Rio Doce															
103		Proprietário: Ricardo La Ccedo			Município/Cidade:			Telefone:			TE:						
72		Responsável Av.: watac			Laboratorista:			Resp. DG30:			Resp. DG60:						
		Resp. D8/D9:			Resp. DG30:			Resp. DG60:			Grau de sangue:						
		VACINA REPRODUTIVA: 1ª			2ª			Sal mineral:			Horário TE:						
		Hormônios:															
		Aval: / /2022 D0: / /2020 D8: / / D9: / /2022 TE: / /2022 DG 30: / / DG60: /															
		Raça CATG CL ECC D0 D8 / D9 TE CL - TE ECC F/V DG 30 ECC DG 60 ECC INFORMAÇÕES															
1																	
2																	
3																	
4																	
5																	
6																	
7																	
8																	
9																	
10																	
11																	
12																	
13																	
14																	
15																	
16																	
17																	
18																	
19																	
20																	
21																	
22																	
23																	
24																	
25																	
26																	
27																	
28																	
29																	
30																	

Fonte: Do autor (2022).

A vaca ou novilha selecionada para receptora necessariamente demonstra parâmetros importantes durante a sua avaliação, ou seja, bom ECC, útero com tamanho e tônus desejável, ovário com espessura aumentada e/ou com presença de estruturas (folículo, CL), indicando atividade ovariana. Animais com útero flácido ou de tamanho infantil e que apresentavam um ovário muito pequeno e sem estrutura palpável eram considerados em anestro e excluídos da seleção. A avaliação de receptora, como demonstrada na figura 21, era realizada apenas pela palpação transretal, mas eventualmente por alguma necessidade, como por exemplo a identificação de líquido no lúmen uterino à palpação, esses animais eram também examinados por ultrassonografia modo B.

Figura 21 – Avaliação de receptoras e diagnóstico de gestação.

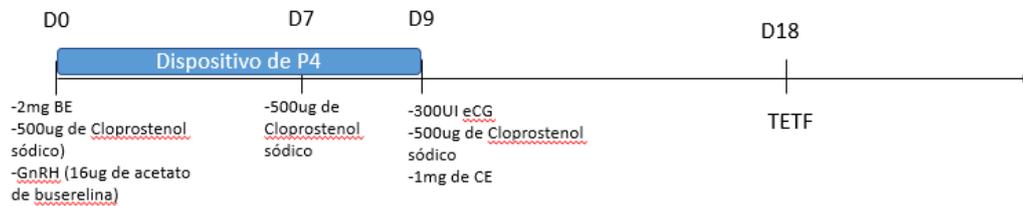


Fonte: Do autor (2022).

5.2.2 Protocolo hormonal para TETF

Com as receptoras selecionadas após a avaliação, os técnicos organizavam junto com os produtores o início do protocolo hormonal de sincronização da ovulação para TETF, como apresentado na figura 22. A equipe da ABS-Pecplan executava o D0 em algumas fazendas e em outras, os próprios produtores, aqueles capacitados, iniciavam o protocolo. Os manejos de D7 e D9 eram de responsabilidade exclusiva dos produtores. O protocolo consistia basicamente na administração de 2mg de BE + inserção do dispositivo de P4 1g de primeiro ou segundo uso no D0, seguida pela administração de 500 microgramas de cloprostenol sódico (PGF_{2a}), 1mg de CE (cipionato de estradiol), 300UI de eCG e remoção do dispositivo de P4 no D9. No dia 18 era realizado a TETF. Algumas adaptações poderiam ser realizadas no protocolo, sendo elas a aplicação do GnRH (vacas de alta produção de leite) ou administração de PGF_{2a} (novilhas com CL no início do tratamento) no D0, e adição de 500 microgramas de cloprostenol sódico (PGF_{2a}) no D7 para vacas leiteiras de alta produção. Na tabela 2 está demonstrado a relação de animais avaliados e animais que iniciaram o protocolo hormonal.

Figura 22 – Protocolo hormonal para sincronização da ovulação da TETF utilizado pela empresa ABS.



Fonte: Do autor (2022).

A empresa, em conjunto com a cooperativa, tem como utilização padrão o protocolo da Empresa Ourofino. Além disso, os produtores tinham a liberdade de optar por outros produtos.

5.2.3 Semana da OPU

Subsequente à semana do início dos protocolos foi realizada a OPU nas fazendas que possuíam animais de genética superior e optaram por usar as suas doadoras a PIVE. A OPU foi executada por dois técnicos da empresa que vieram de Mogi Mirim - SP para Governador Valadares - MG, um aspirador e outro selecionador. Após a montagem dos equipamentos na fazenda e contenção devida do animal, o aspirador administrava 3mL de lidocaína 2%, via epidural, nas doadoras $\frac{1}{2}$ Gir x $\frac{1}{2}$ HO e 2,5 mL nos animais mais apurados para o Zebu, como $\frac{3}{4}$ Gir x $\frac{1}{4}$ HO. Ademais, a aspiração ocorria na fase aleatória do ciclo estral e em todos os folículos “visíveis” no ultrassom do ovário esquerdo e do ovário direito. As vacas gestantes também eram aspiradas, desde que a gestação não estivesse avançada e fosse possível a manipulação dos ovários. O manejo da OPU está representado na figura 23.

Figura 23 – Imagem de aspiração dos folículos na semana da *ovum pick up*.

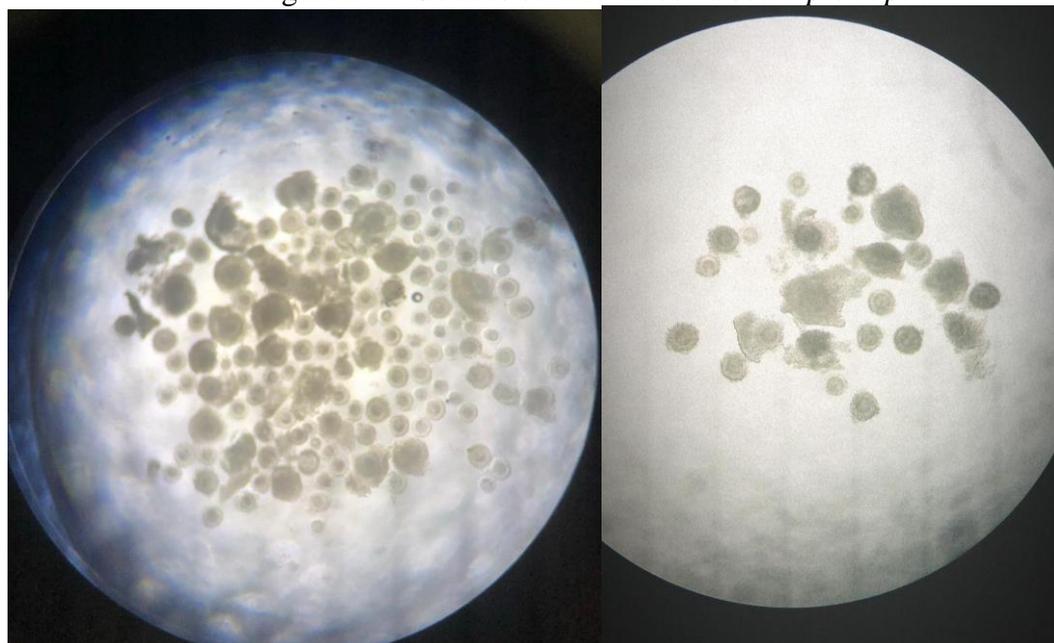


Fonte: Do autor (2022).

Após a aspiração de todos os folículos visíveis, o líquido aspirado era entregue imediatamente para o selecionador, alojado na própria fazenda, se possível o mais próximo do local da OPU.

Após o selecionador receber o fluido folicular da OPU, ele o colocava em um filtro próprio para realizar a lavagem do líquido, selecionava e classificava os oócitos, representados na figura 24, em viáveis (grau 1, 2 e 3) e não viáveis (grau 4). Em seguida os oócitos eram lavados e transferidos para um tubo com meio MIV e atmosfera controlada. Os tubos eram colocados em uma transportadora de oócitos com temperatura regulada para 38°C. O processo se repetia para a aspiração da próxima doadora. Cada animal tinha seu próprio tubo para não misturar os oócitos. Após ser concluída a aspiração de todos os animais no dia, os oócitos presentes na transportadora eram enviados para o laboratório em Mogi Mirim – SP. A maturação dos oócitos era realizada na transportadora, de modo que os oócitos chegavam ao laboratório no momento próximo à FIV. A tabela 3 e os gráficos 4 e 5 demonstram os resultados da semana de OPU.

Figura 24 – Oócitos selecionados na *ovum pick up*.



Fonte: Do autor (2022).

5.2.4 Transferência de embriões em tempo fixo

No dia 18 do protocolo foi realizada a TETF, resultados representados nos gráficos 6 e 7. As receptoras recebiam a administração de lidocaína 2%, 3mL para animais $\frac{1}{2}$ *Bos indicus* x $\frac{1}{2}$ *Bos taurus* e 2,5 mL para animais *Bos indicus* ou $\frac{3}{4}$ *Bos indicus* x $\frac{1}{4}$ *Bos taurus*, representado na figura 26. Antes de começar a montar os embriões nos inovuladores, as receptoras eram avaliadas para saber se responderam ao protocolo. As receptoreas que apresentavam CL na palpação transretal e no exame ultrassonográfico estavam aptas para receber a transferência do embrião.

A ABS realiza a TETF com três tipos de embriões: a fresco, o vitrificado e DT. Apesar de cada um ter sua particularidade no manejo da transferência, há alguns pontos em comum, como utilização da camisinha por cima da bainha nos inovuladores. O embrião é inovulado após a curvatura maior do corno ipsilateral ao do CL.

Os embriões DT possuem a vantagem da sua praticidade a campo, pois eles eram armazenados no botijão de nitrogênio líquido, já envazados em uma paleta de 0,25mL, como mostrado na figura 25. Imediatamente após a avaliação da receptora como apta a receber o embrião, os embriões DT eram descongelados do seguinte método: retirava o embrião congelado do botijão de nitrogênio líquido, esperava 5 segundos com ele na temperatura ambiente e em seguida era mergulhado na água com temperatura igual a 30°C e permanecia por mais 30 segundos. E, então, eles seguiam para os inovuladores, figura 25, para ser feita a TE.

Esse sistema possui grande vantagem pois evita a perda de embrião pela falta de receptora não apta na avaliação e também não necessita de um laboratório para ser descongelado e/ou envazado.

Figura 25 – (esquerda) Descongelamento do embrião Direct Transfer; (direita) montagem do inovulador para a transferência de embriões em tempo fixo.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 26 – (esquerda) Aplicação da anestesia epidural; (direita) passagem do inovulador no trato reprodutivo da receptora durante a transferência de embriões em tempo fixo.



Fonte: Do autor (2022).

Os embriões frescos seguem do laboratório de Mogi Mirim – SP em meio CIV para terminar seu cultivo em Governador Valadares – MG. Então, o técnico realiza a avaliação, no laboratório montado a campo no apartamento (Figura 19), e envaza aqueles que apresentavam uma boa qualidade no 7º dia após a FIV. Esse processo é realizado na madrugada antes do manejo da transferência. Os embriões são enumerados de acordo com o cruzamento descrito na ficha controle, representado na figura 27, e posicionados na transportadora de embriões com temperatura programada de 36°C, como demonstrado na figura 28.

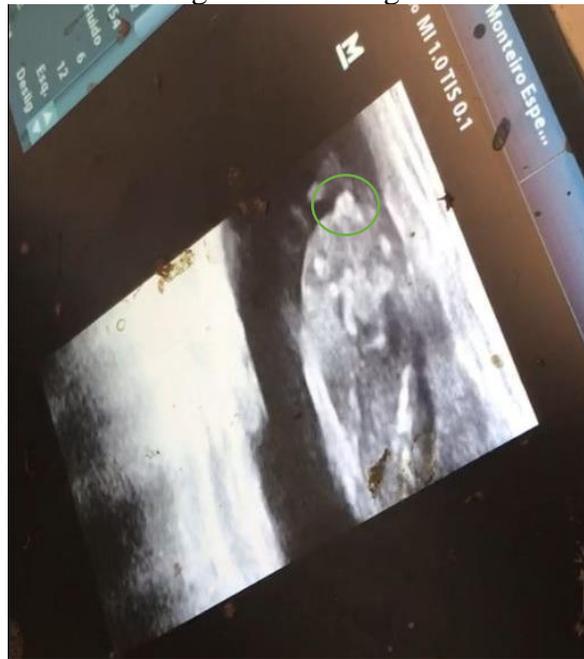
Figura 28 –Estrutura montada a campo para montagem dos inovuladores e controle dos animais no dia da transferência de embriões em tempo fixo.



Fonte: Do autor (2022).

Durante a semana da TETF (18 dias após o início do protocolo) foram realizadas algumas confirmações e sexagens, como demonstrado nas figuras 29 e 30, com aproximadamente 60 dias de gestação, referente aos animais diagnosticados como gestantes no DG da rodada passada de TETF, acompanhado junto com a avaliação das receptoras no início do estágio.

Figura 29 – Sexagem fêmea.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 30 – Sexagem macho.



Fonte: Do autor (2022).

5.3 Relação dos animais e fazendas assistidos durante o período de estágio

Tabela 2 – Relação das receptoras avaliadas para iniciar o protocolo hormonal de transferência de embriões em tempo fíco em 66 fazendas assistidas.

	Nº de Receptoras	%
Protocoladas	940	72,3
Não protocoladas	360	27,7
Avaliadas para TETF	1300	100

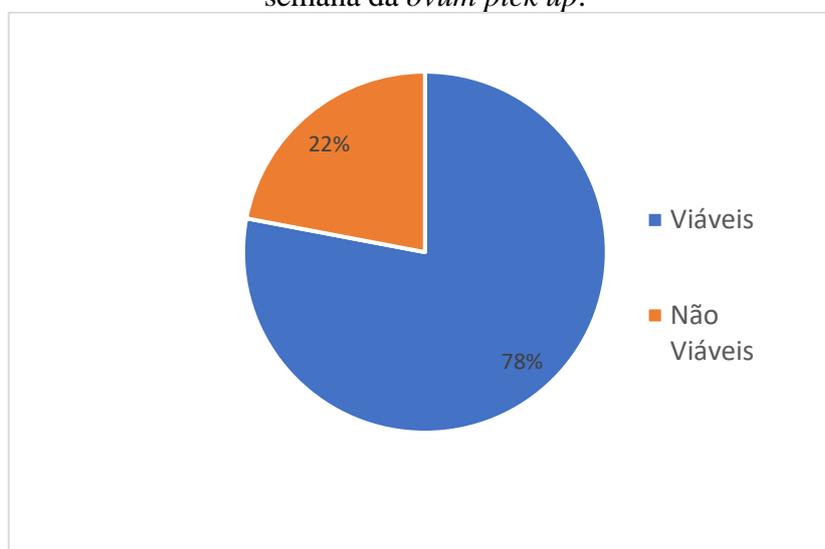
Fonte: Do autor (2022).

Tabela 3 – Relação dos oócitos aspirados na semana da *ovum pick up*.

Nº Fazendas	Nº Doadoras	Nº oócitos viáveis (Grau 1, 2 e 3)	Nº oócitos não viáveis
15	137	2855	3662

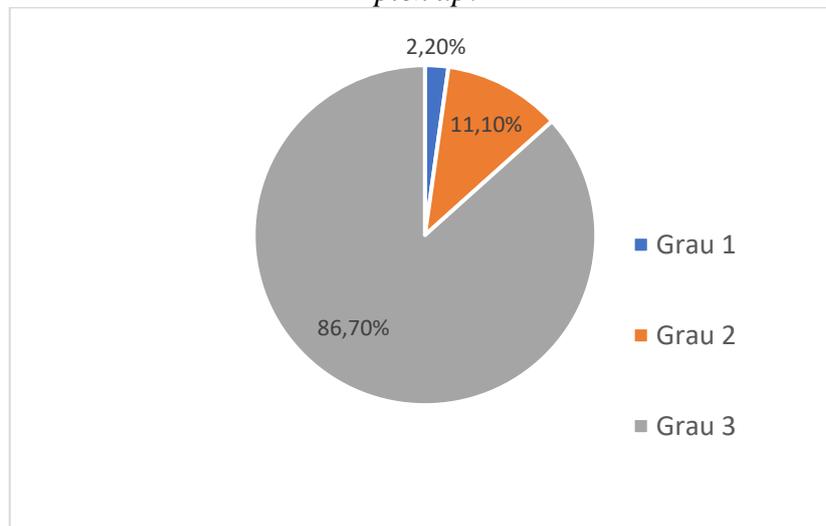
Fonte: Do autor (2022).

Gráfico 4 – Porcentagens de oócitos viáveis (graus 1, 2 e 3) e não viáveis coletados na semana da *ovum pick up*.



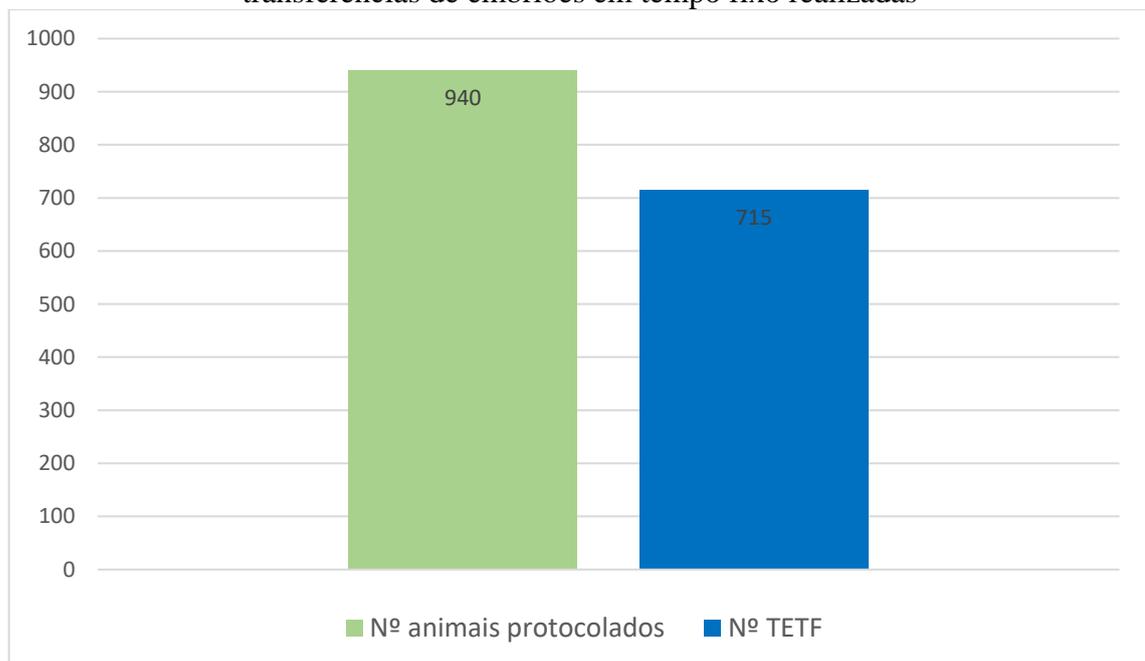
Fonte: Do autor (2022).

Gráfico 5 – Porcentagens de óocitos de grau 1, 2 e 3 coletados na semana da *ovum pick up*.



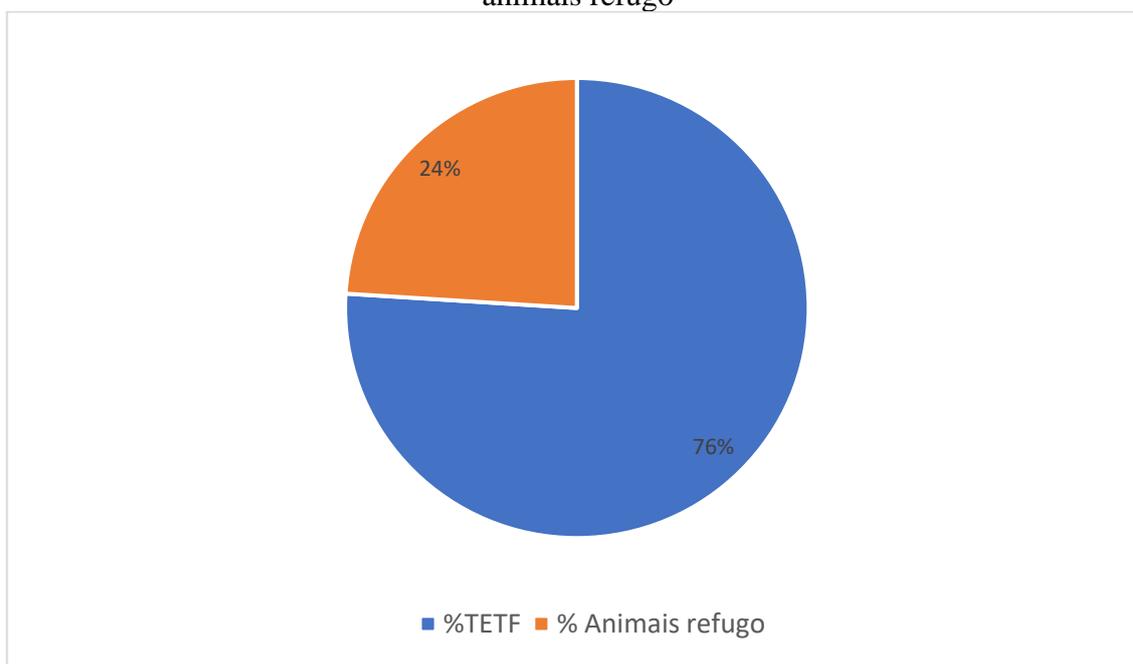
Fonte: Do autor (2022).

Gráfico 6 – Número de animais que receberam o protocolo hormonal e número de transferências de embriões em tempo fixo realizadas



Fonte: Do autor (2022).

Gráfico 7 – Porcentagens de transferências de embriões em tempo fixo realizadas e de animais refugo



Fonte: Do autor (2022).

6 BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO (PIVE E TETF)

6.1 Produção in vitro de embriões (PIVE)

A produção in vitro de embriões é uma biotecnologia reprodutiva que possibilita a formação de um novo embrião fora do trato reprodutivo da fêmea. A técnica teve grande avanço nos últimos anos, principalmente tratando-se do Brasil, país que realizou 57% das transferências de embriões oriundos da PIVE em todo mundo (Viana et al., 2018). O uso da PIVE permite um aumento significativo na eficiência reprodutiva dos rebanhos de corte e de leite quando selecionados animais com genética superior para obtenção dos oócitos (SIRARD et al., 2018). Além da obtenção do ganho genético acentuado, a biotécnica pode ser direcionada para otimizar a reprodução em rebanhos que possuem baixa fertilidade (HANSEN, 2004), ou até mesmo, nas fêmeas de genética superior que possuem algum problema reprodutivo, que as deixam inférteis para a reprodução convencional (ANDRADE et al., 2012).

Com a introdução do sêmen sexado houve um ganho ainda maior com a utilização desta biotecnologia, exemplo disso é em fazendas produtoras de leite, em que um embrião sexado de fêmea possui um maior benefício para produção e economia da propriedade. Ademais, o uso do sêmen sexado em larga escala nos programas de PIVE foi muito bem demonstrado no estudo de Morotti et al. (2014).

A coleta de oócito pela OPU é uma técnica que tem sido utilizada associada a PIVE e que permite a aspiração de vacas e novilhas geneticamente superiores, diminuindo, assim, o intervalo de gerações na propriedade (LEEuw, 2006). A OPU possui a vantagem de não precisar da administração de hormônios para seu procedimento e, com isso, ser realizada em fase aleatória do ciclo estral na doadora, aspirando desde folículos antrais a folículos dominantes, método mais executado por empresas e técnicos que prestam o serviço de PIVE.

Apesar disso, a sincronização de uma nova emergência de onda previamente a aspiração dos folículos com a administração de estradiol e P₄ demonstrou ser eficaz e permitiu o aumento do número de complexos cumulus-oócitos obtidos e blastocistos produzidos em animais *Bos taurus* (BARUSELLI et al., 2016). Pelo maior número de folículos, *Bos indicus* possuem uma maior quantidade de oócitos recuperados na OPU e, conseqüentemente, uma maior produção se comparadas com os *Bos taurus* (BARUSELLI et al 2012). É importante ressaltar que a OPU, quando executada da forma correta, não traz malefícios para o bem estar das doadoras, pois, a concentração sanguínea de cortisol não sofre alteração e também não há decréscimo na produção de leite (CHASTANT-MAILLARD et al., 2003).

Após a realização da OPU, é efetuada a seleção e classificação dos oócitos em Grau 1, Grau 2, Grau 3, Grau 4 (OLIVEIRA et al., 2014). Para a PIVE são aproveitados os oócitos de grau 1, 2 e 3, que posteriormente à classificação são destinados a três etapas: MIV dos oócitos coletados, FIV e o CIV dos embriões (GOLÇALVES et al., 2008)

A fase da MIV consiste em um conjunto sequencial de acontecimentos em que um oócito em estágio de vesícula germinativa progride para a segunda divisão meiótica com o segundo corpúsculo polar (BLANCO et al., 2011). Nesse processo *in vitro*, o oócito completa a sua maturação em 24h (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987). A maturação oócitaria é uma etapa fundamental no processo da PIVE, pois proporciona ao oócito competência e capacidade para ser fecundado. Assim, o processo de maturação está diretamente relacionado com a taxa de embriões produzidos e, conseqüentemente, ao sucesso da PIVE (RUSSELI et al., 2006)

Para a FIV, os oócitos que tiveram sucesso na etapa anterior e se encontram maduros são incubados com os espermatozoides durante um período de 18 a 24 horas (GORDON, 2003). Os espermatozoides devem ser tratados por fatores capacitantes que lhes deem a habilidade de penetrar a zona pelúcida do oócito. A quantidade mínima de espermatozoides requeridos por oócito não é bem estabelecida e há uma grande variação entre os touros reprodutores e suas raças, no entanto, é mais usado na FIV a concentração de 1 a 2 milhões de espermatozoides por mL (WARD et al., 2002).

A terceira fase da PIVE é CIV do embrião, em que os oócitos fertilizados são colocados em meio CIV e armazenados na estufa por sete dias até chegarem ao estágio de blastocisto (FERRÉ et al., 2020). No geral, a taxa de zigotos formados com a fertilização que chegarão ao estágio de blastocisto é de 20 a 40% (RIZOS et al., 2008). Após a CIV, o embrião, agora em estágio de blastocisto, será destinado para a TETF a fresco, ou passará pela criopreservação e será congelado ou vitrificado para, posteriormente, ser transferido para uma receptora com potencial de manter prenhez.

A taxa de concepção ao primeiro serviço com a transferência de embriões PIVE a fresco tem se mostrado interessante, sendo 43,24% (SANCHES et al., 2016). No entanto, embriões a fresco têm pouca praticidade a campo, uma vez que o manejo de sincronização da ovulação de receptoras para estarem aptas a receberem um embrião necessita estar ajustado ao número de embriões que será transferido, sem uma janela para erro. Nesse contexto, surgiu a necessidade da criopreservação embrionária, que possui a vantagem de não precisar descartar embriões que excedam o número de receptoras no dia da TETF. Além disso, a criopreservação facilita a comercialização dos embriões (importação e exportação).

Atualmente, são utilizadas duas técnicas para criopreservação dos embriões, a VIT e o DT. As principais diferenças entre as duas metodologias é a quantidade da concentração de crioprotetores no meio, a velocidade de arrefecimento e o descongelamento (SANCHES et al., 2016).

A VIT consiste no congelamento do embrião de forma rápida e com baixo custo para execução. Para isso, utilizam-se grandes concentrações de crioprotetores que fazem a água celular se solidificar em estado vítreo, não havendo a formação de cristais de gelo que prejudicam o embrião. Outro ponto importante é que a técnica necessita de um laboratório com um profissional treinado para fazer o descongelamento e a avaliação do embrião antes de ser transferido (VAJTA et al., 1998), o que restringe a técnica para ser usada comercialmente em grande escala.

Já o método DT realiza o congelamento do embrião de forma lenta, conferindo para a técnica um maior custo para sua execução. Contudo, apesar desse maior custo, esta técnica é mais prática e acessível para ser aplicada comercialmente em larga escala, pois elimina a necessidade do descongelamento em laboratório e de um profissional preparado para isso. Em adição, ela também utiliza menor concentração de crioprotetores, reduzindo a toxicidade para os embriões (SANCHES et al., 2016)

6.2 Transferência de embrião em tempo fixo (TETF)

A TE é uma importante estratégia para obtenção de um ganho genético acelerado em rebanhos de leite e corte, possibilitando o aumento da produção em um menor tempo investido e melhores índices reprodutivos (PELLEGRINO et al., 2016). Basicamente, ela consiste na transferência de embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro* (mais utilizado atualmente), de doadoras com valor genético superior para uma receptora que tem potencial para gestar, mesmo que com baixo valor zootécnico. Assim, uma fêmea doadora pode produzir maior número de descendentes superiores geneticamente durante sua vida reprodutiva, reduzindo o intervalo de gerações e aumentando significativamente a velocidade do melhoramento genético na propriedade (ANDRADE et al., 2002).

Além das vantagens já mencionadas, a TE possibilita que fêmeas em condições de subfertilidade, estresse pelo calor excessivo, problemas com o ambiente uterino, alta taxa de perda embrionária ou baixa taxa de concepção, possam ser trabalhadas na reprodução (RODRIGUES et al., 2010).

Para garantir o sucesso da técnica e, conseqüentemente, o sucesso da PIVE, é preciso trabalhar de forma adequada alguns fatores limitantes, como, estabelecer uma nutrição bem alinhada de acordo com a necessidade das receptoras, uma vez que elas permitirão o seguimento da gestação, e garantir uma eficiente sincronização de estro com o máximo de ovulações (MAPLETOFT; BÓ, 2016). Para garantir a eficiência de um desses fatores limitantes como a detecção de estro, os protocolos para a sincronização da ovulação em um tempo determinado, que originalmente foram desenvolvidos para IATF, podem ser utilizados também de forma satisfatória em receptoras inseridas no programa de TETF (BÓ et al., 2012a). Tendo isso em vista, o protocolo para sincronização da emergência de uma nova onda e sincronização da ovulação para receptoras mais utilizado na América do Sul são aqueles a base de estradiol e P₄, que consistem na administração de 2mg BE e inserção do dispositivo intravaginal de P₄ para indução de uma nova emergência da onda folicular, seguidas da administração intramuscular de PGF_{2α}, 300UI de eCG, 1mg de CE e remoção do dispositivo de P₄ no D7, D8 ou D9 para realizar o controle da progesterona e a sincronização da indução a ovulação. As receptoras que responderem ao protocolo apresentando CL no D16, D17 ou D18 recebem o embrião pela técnica de TETF (BARUSELLI et al., 2010).

Dessa forma, embriões a fresco ou vitrificados necessitam de um número maior de receptoras sincronizadas para diminuir a perda pelas receptoras que não responderam ao protocolo (SIQUEIRA et al., 2009).

7 CONCLUSÃO

As experiências adquiridas durante o estágio tanto no âmbito de pesquisa como no comercial agregaram confiança, conhecimento teórico e prático ao exercício da profissão. Em adição, mostraram a realidade da rotina comercial de uma empresa com grande demanda de animais assistidos e de uma instituição de pesquisa com métodos diversos para atuar na área da reprodução animal.

Portanto, a oportunidade de realizar o estágio supervisionado nos dois locais foi de grande importância para o crescimento pessoal e profissional nesta etapa final da graduação, além de confirmar que a reprodução animal de bovinos é um segmento da medicina veterinária extremamente promissor e desafiador para o médico veterinário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, R.; SILVA, M.; CONSENTINI, C.; SILVA, L.; FOLCHINI, N.; OLIVtA, A., et al. Hormonal combinations aiming to improve reproductive outcomes of *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed AI protocols. **Theriogenology**. 2021;169:89 e 99. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.04.007>.
- ANDRADE, G. A.; FERNANDES, M. A.; KNYCHALA, R. M.; PEREIRA JUNIOR, M. V.; OLIVEIRA, A. J.; NUNES, D. P.; BONATO, G. L.; SANTOS, R. M. Fatores que afetam a taxa de prenhe de receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 36, n. 1, p. 66-69, 2012.
- ANDRADE, J. C. O.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; SANTOS FILHO, A. S.; PINA, V. M. R. Use steroid hormone treatments prior to superovulations in Nelore donors. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 69, n. 1-2, p. 9-14, Jan. 2002.
- ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Index Asbia, 1º semestre, 2021. p.1-37.
- AYRES, H.; FERREIRA, R. M. DE SOUZA; TORRES-JÚNIOR, J. R.; DEMETRIO, C. G. B., DE LIMA, C. G.; BARUSELLI, P. S. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. **Livest Sci** 2009;123:175e9. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.11.00>
- BARUSELLI, P. S.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; FERREIRA, R. M.; GUERREIRO, B. G.; BAYEUX, B. M.; SALES, J. N. S.; SOUZA, A. H.; GIMENES, L. U.. Factors that interfere with oocyte quality for in vitro production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. **Animal Reproduction**, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 264-272, 2016. Colegio Brasileiro de Reproducao Animal - CBRA. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-ar861>.
- BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; COLLI, M. H. A.; ELLIFF, F. M.; SÁ_FILHO, M. F.; VIEIRA, L.; FREITAS, B. G.. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in brazil. **Animal Reproduction**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 558-571, 2017. Colegio Brasileiro de Reproducao Animal - CBRA. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-ar999>.
- BARUSELLI, Pietro S.; FERREIRA, Roberta M.; SÁ FILHO, Manoel F.; NASSER, Luiz F. T.; RODRIGUES, Carlos A.; BÓ, Gabriel A.. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. **Reproduction, Fertility And Development**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 67, 2010. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/rd09214>.
- BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; MADUREIRA, E. H.; CAMPOS FILHO, E. P. 2002. Effect of different treatments for timed artificial insemination on the reproductive efficiency in lactating beef cows. **Rev Bras Reprod Anim**, 26:218-221.
- BARUSELLI, P.S; REIS, E.L; MARQUES, M.O; NASSER, L.F; BÓ, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, [S.L.], v. 82-83, p. 479-486, jul. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.025>.

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, Mf; FERREIRA, Rm; SALES, Jns; GIMENES, Lu; VIEIRA, Lm; MENDANHA, Mf; BÓ, Ga. Manipulation of Follicle Development to Ensure Optimal Oocyte Quality and Conception Rates in Cattle. **Reproduction In Domestic Animals**, [S.L.], v. 47, p. 134-141, 25 jul. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02067.x>.

BARUSELLI, P. S. et al. Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. **Animal** (2018), 12:S1, pp s45–s52 © The Animal Consortium 2018 doi:10.1017/S175173111800054X.

BARUSELLI, P.S. IATF bate mais um recorde e supera 26 milhões de procedimentos em 2021. Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP, 6a ed., 2022. Acesso <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>

BINELLI M, TATCHER WW, MATTOS R, BARUSELLI PS. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* 2001;56:1451e63.

BISINOTTO, R.s.; CASTRO, L.O.; PANSANI, M.B.; NARCISO, C.D.; MARTINEZ, N.; SINEDINO, L.D.P.; PINTO, T.L.C.; BURGWAL, N.s. van de; BOSMAN, H.M.; SURJUS, R.s.. Progesterone supplementation to lactating dairy cows without a corpus luteum at initiation of the Ovsynch protocol. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 98, n. 4, p. 2515-2528, abr. 2015. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-9058>.

BLANCO, M. R.; DEMYDA, S.; MORENO MILLÁN, M.; GENERO, E.; Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: A review. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v.6, n.7, p.155-165, 2011.

BÓ G.A.; BARUSELLI, P.S.; MAPLETOFT, R.J.; Synchronization techniques to increase the utilization of artificial insemination in beef and dairy cattle. **Animal Reproduction** 10, 137–142, 2013.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MAPLETOFT, R.J.; Increasing pregnancies following synchronization of bovine recipients. **Animal Reproduction**, 9:312-317. 2012a.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R.J.. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, [S.L.], v. 57, n. 1, p. 53-72, jan. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00657-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00657-4).

BÓ, G. A.; CUTAIA, L.; PERES, L. C.; PINCINATO, D.; MARAÑA, D.; BARUSELLI, P. S. 2007. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. **Soc Reprod Fertil Suppl**, 64:223-236

BÓ, G.A.; DE LA MATA, J.J.; BARUSELLI P.S.; MENCHACA, A. 2016. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology*, 86:388-396.

CARVALHAES, R. P. A.; COLLI, M. H. A.; ALMEIDA, T. T.; MINGOTI, R. D.; VIEIRA, L. M.; SANTOS M. H.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. 2016. Pregnancy rate following

FTA of nelore (*Bos indicus*) cows submitted to protocols of 3 or 4 cattle handling with administration of PGF in different moments. **Anim Reprod**, 13:432. (abstract).

CHASTANT-MAILLARD, S.; QUINTON, H.; LAUFFENBURGER, J.; CORDONNIER-LEFORT, N.; RICHARD, C.; MARCHAL, J.; MORMEDE, P.; RENARD, J. P. Consequences of transvaginal follicular puncture on weel-being in cows. **Reproduction**, v. 125, p. 555-563, 2003.

CHEBEL, R.C.; SANTOS, J.e.P.. Effect of inseminating cows in estrus following a presynchronization protocol on reproductive and lactation performances. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 93, n. 10, p. 4632-4643, out. 2010. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3179>.

CREPALDI, G. A.; FREITAS, B. G.; MINGOTI, R. D.; COLLI, M. H. A.; GONÇALES JUNIOR, W. A.; FERREIRA, R. M.; BARUSELLI, P. S. Reproductive efficiency of Nelore cows submitted to three different reproductive strategies in a 64 days breeding season. **Anim Reprod**. 2017;14:698.

DISKIN, Mg; MORRIS, Dg. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. **Reproduction In Domestic Animals**, [S.L.], v. 43, p. 260-267, jul. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01171.x>.

FERRÉ, L.B.; KJELLAND, M.e.; STRØBECH, L.B.; HYTTEL, P.; MERMILLOD, P.; ROSS, P.J.. Review: recent advances in bovine in vitro embryo production. **Animal**, [S.L.], v. 14, n. 5, p. 991-1004, 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1017/s1751731119002775>.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J.M.P.. Ovarian follicular dynamics in nelore breed () cattle. *Theriogenology*, [S.L.], v. 47, n. 8, p. 1489-1505, jun. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)00156-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00156-8).

FRICKE PM, GUENTHER JN, WILTBANK MC. Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.50, p.1275-1284, 1998.

FRICKE, P.M.. Scanning the Future—Ultrasonography as a Reproductive Management Tool for Dairy Cattle. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 85, n. 8, p. 1918-1926, ago. 2002. American Dairy Science Association. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(02\)74268-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(02)74268-9).

FRIEDRICH, M; HOLTZ, W. Establishment of an ELISA for Measuring Bovine Pregnancy-Associated Glycoprotein in Serum or Milk and Its Application for Early Pregnancy Detection. **Reproduction In Domestic Animals**, [S.L.], v. 45, n. 1, p. 142-146, fev. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01287.x>.

GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging and animal reproduction: Book 2, Horses. **Cross Plains, WI: Equiservices Publishing**, 394p, 1995.

GIROTTO, R.W. et al. Efeito do uso de PGF2 α no D0 e diferentes doses de eCG no D8 de protocolos de IATF com dispositivo cronipres® mono dose 1g sobre a taxa de concepção de novilhas nelore cíclicas. **Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, Foz do Iguaçu, p.199, 2016.

GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISINTIN, J. A.; COSTA, L. F. S. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2nd. Ed. 2008. São Paulo, Rocca, p. 261- 291.

GORDON, I. **Laboratory Production of Cattle Embryos**, 2nd Edition, CAB International, University Press, Cambridge, 548 p. 2003.

GUIMARAES, A.; NISHIMURA, T. K.; ROCHA, C. C.; MOTTA, I., G., et al. Comparison of estradiol benzoate doses for resynchronization of ovulation at 14 days after timed-AI in suckled beef cows. **Theriogenology** 184 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.02.025> 0093-691X/© 2022 Published by Elsevier Inc.

HANSEN, Peter J.; BLOCK, Jeremy. Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. **Reproduction, Fertility And Development**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 1, 2004. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/rd03073>.

IBGE - Instituto brasileiro de geografia e estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM), 2020. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-denoticias/releases/31722-ppm-2020-rebanho-bovino-cresce-1-5-e-chega-a-218-2-milhoes-de-cabecas>.

LAMB, Graham Clifford; MERCADANTE, Vitor R.G.. Synchronization and Artificial Insemination Strategies in Beef Cattle. **Veterinary Clinics Of North America: Food Animal Practice**, [S.L.], v. 32, n. 2, p. 335-347, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.006>.

LEEuw, A.M. van Wagendonk-De. Ovum Pick Up and In Vitro Production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. **Theriogenology**, [S.L.], v. 65, n. 5, p. 914-925, mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.007>.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; CRITSER, E. S.; EYESTONE, W. H.; NORTHEY, D. L.; FIRST, N. L.. Development Potential of Bovine Oocytes Matured in Vitro or in Vivo1. **Biology Of Reproduction**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 376-383, 1 mar. 1987. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod36.2.376>.

LIMA, F.s.; VRIES, A. de; RISCO, C.A.; SANTOS, J.e.P.; THATCHER, W.W.. Economic comparison of natural service and timed artificial insemination breeding programs in dairy cattle. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 93, n. 9, p. 4404-4413, set. 2010. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2009-2789>.

MAPLETOFT, R. J; BÓ, G. A. 2016. Bovine embryo transfer. In: International Veterinary Information Service (Ed.). **IVIS Reviews in Veterinary Medicine. Ithaca: International Veterinary Information Service**. (www.ivis.org; Document No. R0104.1106S).

MELO, L.F.; MONTEIRO, P.L.J.; NASCIMENTO, A.B.; DRUM, J.N.; SPIES, C.; PRATA, A.B.; WILTBANK, M.C.; SARTORI, R.. Follicular dynamics, circulating progesterone, and fertility in Holstein cows synchronized with reused intravaginal progesterone implants that were sanitized by autoclave or chemical disinfection. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 101,

n. 4, p. 3554-3567, abr. 2018. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13570>.

MONTEIRO, P.L.J.; BORSATO, M.; SILVA, F.L.M.; PRATA, A.B.; WILTBANK, M.C.; SARTORI, R.. Increasing estradiol benzoate, pretreatment with gonadotropin-releasing hormone, and impediments for successful estradiol-based fixed-time artificial insemination protocols in dairy cattle. **Journal Of Dairy Science**, [S.L.], v. 98, n. 6, p. 3826-3839, jun. 2015. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-9040>.

MOROTTI, F.; SANCHES, B.V.; PONTES, J.H.F.; BASSO, A.C.; SIQUEIRA, E.R.; LISBOA, L.A.; SENEDA, M.M.. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. **Theriogenology**, [S.L.], v. 81, n. 5, p. 696-701, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.12.002>.

MOTTA IG, ROCHA CC, BISINOTTO DZ, MELO GD, ATAIDE JÚNIOR GA, SILVA AG, et al. Increased pregnancy rate in beef heifers resynchronized with estradiol at 14 days after TAI. *Theriogenology* 2020;147:62e70. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.009>.

OJEDA-ROJAS, Oscar Alejandro; GONELLA-DIAZA, Angela María; BUSTOS-CORAL, Daniel; SARTORELLO, Gustavo L.; REIJERS, Thayla S.s.s.; PUGLIESI, Guilherme; MERCADANTE, Maria Eugênia Zerlotti; LIMA, Cesar G. de; GAMEIRO, Augusto H.. An agent-based simulation model to compare different reproductive strategies in cow-calf operations: technical performance. **Theriogenology**, [S.L.], v. 160, p. 102-115, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.035>.

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.

PELLEGRINO, C. A. G., MOROTTI, F., UNTURA, R. M., PONTES, J. H. F., PELLEGRINO, M. F. O., CAMPOLINA, J. P., SENEDA, M. M., BARBOSA, F. A., & HENRY, M. (2016). Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of in vitro produced embryos in cattle. *Theriogenology*, 86(1), 888-893.

PESSOA, G. A.; MARTINI, A. P.; CARLOTO, G. W.; RODRIGUES, M. C. C.; CLARO JÚNIOR, I.; BARUSELLI, P. S.; BRAUNER, C. C.; RUBIN, M. I. B.; CORRÊA, M. N.; LEIVAS, F. G.. Different doses of equine chorionic gonadotropin on ovarian follicular growth and pregnancy rate of suckled *Bos taurus* beef cows subjected to timed artificial insemination protocol. **Theriogenology**, [S.L.], v. 85, n. 5, p. 792-799, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.057>.

PUGLIESI, G.; BEG, M. A.; CARVALHO, G. R.; GINTHER, O. J. Induction of PGFM pulses and luteolysis by sequential estradiol-17b treatments in heifers. **Theriogenology**. 2012;77:492e506. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.08.020>.

PUGLIESI, G.; MIAGAWA, B. T.; PAIVA, Y. N; FRANÇA, M. R.; SILVA, L. A; BINELLI, M. Conceptus-induced changes in the gene expression of blood immune cells and the

ultrasound-accessed luteal function in beef cattle: How early can we detect pregnancy? **Biol Reprod.** v.95, p.1-12, 2014b.

PUGLIESI, G.; PINAFFI, F. L. V.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Use of corpus luteum area as a predictor of ongoing functional luteolysis in dairy heifers. **Reprod, Fert and Develop.** v.25, p. 235, 2013.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. **Theriogenology**, 44:915-923.

QUINTELA, L. A.; BARRIO, M.; PEÑA, A. I; BECERRA, J. J.; CAINZOS, J.; HERRADÓN, P. G.; DÍAZ, C. Use of ultrasound in the reproductive management of dairy cattle. **Reprod Domest Anim**, v.47, p.34-44, 2012.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P. DE LA FUENTE J.; LONERGAN P AND GUTIÉRREZ-ADÁN, A. 2008. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. **Reproduction in Domestic Animals.** 43, 44–50.

RODRIGUES, C. A.; TEIXEIRA, A. A.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; MANCILHA, R. F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 110-117, 2010.

RUSSELLI, D. F.; BAGIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS, D. H. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1255-1270, 2006.

SA FILHO, M. F.; MARQUES, M. O.; GIROTTO, R.; SANTOS, F. A.; SALA, R. V.; BARBUIO, J. P.; et al. Resynchronization with unknown pregnancy status using progestin-based timed artificial insemination protocol in beef cattle. **Theriogenology** 2014;81:284e90. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.027>

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P; CREPALDI, G. A.; CIPRIANO, R. S.; JACOMINI, J. O.; MAIO, J. R. G.; SOUZA, J. C.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P. S. 2012. 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**, 78:510- 516.

SANCHES, B. V.; LUNARDELLI, P. A.; TANNURA, J. H.; CARDOSO, B. L.; PEREIRA, M. H. C.; GAITKOSKI, D.; BASSO, A. C.; ARNOLD, D. R.; SENEDA, M. M. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF Embryos. **Theriogenology**, v. 85, p. 1147-1151, 2016.

SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. R.; MOROTTI, F.; SANCHES, B. V.; DE MORAES, F. L. Z.; BLASCHI, W.; SENEDA, M. M., 2016. High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. **Anim. Reprod. Sci.** 165, 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.11.024>.

SIQUEIRA, L. G. B.; AREAS, V. S.; GHETTI, A. M.; FONSECA, J. F.; PALHAO, M. P.; FERNANDES, C. A. C, et al. Color Doppler flow imaging for the early detection of

nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. **J Dairy Sci** 2013;96:6461e72. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6814>.

SIQUEIRA, L. G. B.; TORRES, C. A. A.; SOUZA, E. D.; MONTEIRO, J.R., P. L. J.; ARASHIRO, E. K. N.; CAMARGO, L. S. A.; FERNANDES, C. A. C.; VIANA, J. H. M. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. **Theriogenology**, v. 72, p. 949-958, 2009.

SIRARD, M. A. 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. **Reproduction** 2018;156:R1e7. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0008>.

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C.; PALMARINI, M. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. **Reprod Fertil Dev.** 2007;19:65e78. <https://doi.org/10.1071/RD06102>

THATCHER, W. W.; MEYER, M. D.; DANET-DESNOYERS, G. Maternal recognition of pregnancy. **J Reprod Fertil Suppl** 1995; 49:15–28.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P. J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T., et al. Open Pulled 335 Straw (OPS) Vitrification: A New Way to Reduce Cryoinjuries of Bovine Ova and 336 Embryos. **Mol Reprod Dev** 1998;51:53 – 8.

VIANA, J. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter.** 36:8-25. 2018. 2017.

VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. **Theriogenology** 59, 571–584. 2003.

WARD, F.; ENRIGHT, B.; RIZOS, D.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology.** 57, 2105–2117. 2017.

WATANABE, Y.; SOUZA, H. A.; MINGOTI, R.; FERREIRA, R.; OLIVEIRA, S. B. E.; DAYAN, A.; WATANABE, O.; MEIRELLES, F.; NOGUEIRA, M.; FERRAZ, J.; BARUSELLI, P. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. **Animal Reproduction** 14, 635–644. 2017.

WILTBANK, M.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GÜMEN, A. 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, 65:17-29.

WILTBANK, M. C.; SARTORI, R.; HERLIHY, M. M.; VASCONCELOS, J. L. M.; NASCIMENTO, A. B.; SOUZA, A. H.; AYRES, H.; CUNHA, A. P.; KESKIN, A.; GUENTHER, J. N.; GUMEN, A. 2011. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, 76:1568-1582.

WILTBANK, M.; BAEZ, G. M.; COCHRANE, F.; BARLETTA, R. V.; TRAYFORD, C. R.; JOSEPH, R. T. Effect of a second treatment with prostaglandin F₂ α during the Ovsynch protocol on luteolysis and pregnancy in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2015, 98, 8644–8654.