



**BEATRIZ KETELIN SOUSA VASCONCELOS**

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA EMPRESA  
PECPLAN ABS IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA, EM  
MOGI MIRIM – SP E LLD PESQUISA E  
DESENVOLVIMENTO EM PRODUÇÃO ANIMAL LTDA ME,  
EM OLIVEIRA-MG**

**LAVRAS – MG  
2022**

**BEATRIZ KETELIN SOUSA VASCONCELOS**

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA EMPRESA PECPLAN ABS  
IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA, EM MOGI MIRIM-SP E LLD PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO EM PRODUÇÃO ANIMAL LTDA ME, EM OLIVEIRA-  
MG**

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

Profa. Dra. Mary Suzan Varaschin  
Orientadora

**LAVRAS-MG  
2022**

**BEATRIZ KETELIN SOUSA VASCONCELOS**

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO NA EMPRESA PECPLAN ABS  
IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA, EM MOGI MIRIM – SP E LLD PESQUISA  
E DESENVOLVIMENTO EM PRODUÇÃO ANIMAL LTDA ME, EM OLIVEIRA-MG**

**SUPERVISED INTERNSHIP PERFORMED AT THE COMPANY PECPLAN ABS  
IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA, IN MOGI MIRIM – SP AND LLD  
RESEARCH AND DEVELOPMENT IN PRODUCTION ANIMAL LTDA ME, IN  
OLIVEIRA-MG**

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

APROVADO em 13 de setembro de 2022.

Dra. Mary Suzan Varaschin UFLA  
Dra. Bárbara Azevedo Pereira Torres UFLA  
Msc. Ivam Moreira de Oliveira Júnior UFLA

Profa. Dra. Mary Suzan Varaschin  
Orientadora

**LAVRAS-MG  
2022**

*À Deus e a minha família, que sempre  
estiveram ao meu lado. Sem vocês nada seria  
possível.  
Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus que sempre esteve ao meu lado me conduzindo, dando forças e perseverança para vencer todas as dificuldades que se apresentaram.

Aos meus pais Dirceu e Aparecida, às minhas irmãs Sinnara e Tascianny e ao meu namorado Carlos Filipi que não mediram esforços para me apoiar durante toda graduação, sempre estiveram ao meu lado lembrando-me que sou capaz de enfrentar as dificuldades e assim, me dando forças para continuar. Ao meu cunhado Elton que sempre torceu pelas minhas conquistas. A Dona Suelly e ao Otto por terem me recebido em sua casa, sempre me apoiando na busca de meus sonhos. Aos meus sobrinhos Micaelly, João Miguel e Maria Luísa por serem minha luz, por vocês tento ser uma pessoa melhor a cada dia e crio coragem para vencer cada batalha. A vocês não tenho palavras para agradecer.

As minhas amigas Ana Laura, Francielle, Nayara, Roberta e Valéria que foram minha família em Lavras, estiveram comigo em todos os momentos, compartilhando momentos de angústia, medos, conquistas e enfrentando os problemas juntas, “ninguém solta a mão de ninguém”. Não imagino como teria sido sem vocês ao meu lado.

A toda empresa Terra Júnior Agropecuária por todo aprendizado e momentos inesquecíveis, em especial a Denise e Leandro. A todos que de alguma forma fizeram e fazem parte da minha graduação, aos quais não conseguiria citar sem esquecer alguém, obrigado por tudo.

A minha orientadora Mary, por todo apoio, confiança depositada em mim e por tudo que me ensinou durante esses anos de trabalho. Aos meus colegas no Setor de Patologia Veterinária, os pós-graduandos e estagiários que por ali passaram durante minha permanência e, principalmente, os professores Angélica, Flademir e Djeison que sempre estiveram acessíveis e dispostos a me ajudar e ensinar.

A toda equipe do Laboratório ABS de Mogi Mirim-SP e da empresa REPRODUZA pelo acolhimento e ensinamentos oferecidos, orientação, carinho, amizade e paciência em compartilhar seus conhecimentos.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e contribuírem na conclusão deste trabalho.

A todos, muito obrigado!

## **RESUMO**

Este relatório descreve as atividades realizadas na disciplina estágio supervisionado (PRG107), ofertada no último período do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras. O estágio foi realizado em duas empresas de biotecnologia de embrião, no período de 01 de junho a 09 de setembro de 2022, com uma carga horária total de 520 (quinhentos e vinte) horas. A primeira etapa foi realizada na PECPLAN ABS em Mogi Mirim-SP, sob a supervisão do médico veterinário Raphael Martins Cezaro. Nesta empresa acompanhei a rotina da produção de embriões em laboratório e realizamos a análise da produção de embriões por categoria de animais do ano fiscal de 2021. Baseado nesse assunto foi realizada uma revisão de literatura. A segunda etapa do estágio supervisionado foi realizada na empresa REPRODUZA em Oliveira-MG, sob a supervisão do médico veterinário Fernando Franqueira de Melo, onde acompanhei as atividades a campo e laboratoriais envolvidas nos protocolos e metodologias de transferência de embrião.

**Palavras-chave:** Aspiração folicular, transferência de embrião, FIV, bovinos, reprodução

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Localização da filial ABS Pecplan em Mogi Mirim-SP .....	15
Figura 2– Sala transição e paramentação da filial PECPLAN ABS, Mogi Mirim-SP.....	15
Figura 3– Sala de produção in vitro de embriões e laboratório comercial da filial PECPLAN ABS, Mogi Mirim-SP.....	16
Figura 4– Sala de congelamento de embriões da filial PECPLAN ABS, Mogi Mirim-SP.....	16
Figura 5– Sala de produção de meios de cultivo da filial PECPLAN ABS, Mogi Mirim-SP .	16
Figura 6– Cozinha da filial PECPLAN ABS, Mogi Mirim-SP.....	17
Figura 7– Sala de campo da filial PECPLAN ABS, Mogi Mirim-SP.....	17
Figura 8– Sala de sêmen da filial PECPLAN ABS, Mogi Mirim-SP .....	17
Figura 9– Caderno de FIV da filial PECPLAN ABS, Mogi Mirim-SP. ....	18
Figura 10– Conferência dos tubos de maturação.....	19
Figura 11– Estruturas clivadas .....	21
Figura 12– Embriões em D6.....	22
Figura 13 – Modelo de envase para TE.....	23
Figura 14 – Transportadora de embriões.....	24
Figura 15 – Modelo de palheta de DT.....	25
Figura 16 – Impressão dos adesivos do DT.....	25
Figura 17 – Localização da empresa REPRODUZA em Oliveira- MG.....	31
Figura 18 – Sala de recepção da empresa REPRODUZA em Oliveira- MG.....	31
Figura 19 – Cozinha da empresa REPRODUZA em Oliveira- MG.....	32
Figura 20 – Administração e sala de reuniões da REPRODUZA em Oliveira- MG. ....	32
Figura 21 – Sala de preparação e estoque de sêmen da REPRODUZA em Oliveira- MG. ....	32
Figura 22 – Laboratório de FIV da REPRODUZA em Oliveira- MG.....	32
Figura 23 – Sala de material do campo da REPRODUZA em Oliveira- MG.....	33
Figura 24- Escore de condição corporal.....	34
Figura 25- Animais não selecionados para protocolo de receptora.....	34
Figura 26- Animais selecionados para protocolo de receptoras .....	34
Figura 27- Início do protocolo com uma dose de 2 mL de Benzoato de estradiol (A) e implante de P4 (B e C) .....	35
Figura 28 – Material para OPU. ....	36
Figura 29 – Material para selecionar oócitos.....	36
Figura 30 – Oócitos selecionados.....	37

Figura 31 - Equipamento de transferência de embrião.....	38
Figura 32- Realização da transferência de embrião.....	39
Figura 33- Sexagem de fêmea realizada com 65 dias de vida do feto.....	39

**LISTAS DE TABELAS**

Tabela 1- Classificação dos embriões por morfologia embrionária .....	22
Tabela 2- Tabela das análises da produção de embriões no ano fiscal de 2021 obtidos na PECPLAN ABS, filial Mogi-Mirim.....	29

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

°C	Graus Celsius
µL	Microlitros
mg	Miligrama
mL	Mililitro
PIV	Produção in vitro de embriões
OPU	Ovum pick-up, aspiração folicular
SFB	Soro fetal bovino
RP	Receptor de progesterona
TE	Transferência de embrião
SPRD	Sem padrão racial definido
FIV	Fertilização in vitro
CIV	Cultivo
DT	Trasnsfer ou OneStep
VIT	Vitrificação
SOF	Synthetic Oviductal Fluid
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
OPS	Open pulled straw
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
EG	Etilenoglicol
DMSO	Dimetilsulfóxido
P4	Progesterona
E <sub>2</sub>	Estradiol
CL	Corpo lúteo
eCG	Gonadotrofina
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	13
CAPÍTULO 1 .....	14
1 PECPLAN ABS IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA .....	14
1.1 Descrição do local de estágio .....	14
1.2 Instalações .....	15
2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS .....	18
2.1.1 Fertilização in vitro.....	18
2.1.2 Cultivo in vitro (CIV).....	20
2.1.3 Direct Transfer ou One Step (DT).....	24
2.1.4 Vitrificação (VIT).....	26
3 Análise das categorias por embriões produzidos no ano fiscal Pecplan ABS.....	26
3.1 Produção de embrião por categoria de animais .....	26
3.1.1 Revisão de literatura .....	26
3.1.2 Análise dos dados .....	29
CAPÍTULO 2 .....	30

	12
1 LLD Pesquisa e Desenvolvimento em Produção Animal LTDA ME, REPRODUZA.....	30
1.1 Descrição do local de estágio .....	30
1.2 Instalações .....	31
2 Atividades desenvolvidas .....	33
2.1.1 Protocolo em receptora.....	33
2.1.2 Aspiração folicular (OPU).....	35
2.1.4 Laboratório de embriões.....	37
2.1.5 Transferência de embriões.....	37
2.1.6 Diagnóstico de gestação e sexagem.....	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
REFERÊNCIAS.....	41

## INTRODUÇÃO

A disciplina estágio supervisionado (PRG107) é ofertada no último período do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, com uma carga horária total de 520 (quinhentos e vinte) horas. Essa disciplina consiste na realização do estágio obrigatório em área (s) de sua maior afinidade, pelos alunos sendo sua execução obrigatória para a obtenção do título de Médico Veterinário. O estágio supervisionado é a etapa da graduação que consolida a formação do estudante, colocando em prática todo o aprendizado obtido nos quatro anos e meio do curso de Medicina Veterinária. Além disso, possibilita o aperfeiçoamento técnico mediante a execução de atividades desempenhadas na área de escolha. Esse trabalho consiste no relatório de estágio, o qual foi realizado no período de 01 de junho a 09 de setembro de 2022, dividido em duas etapas, sob a orientação da Profa. Mary Suzan Varaschin.

A primeira etapa foi realizada na PECPLAN ABS em Mogi Mirim-SP, sob a supervisão do médico veterinário Raphael Martins Cezaro, durante o período de 01 de junho a 30 de julho de 2022, totalizando uma carga horária de 344 horas de atividades. Nesta empresa, que é um laboratório especializado em produções de embriões, acompanhamos a rotina da produção de embriões em laboratório, que inclui desde a conferência do material recebido, auxílio nas anotações, preparação dos materiais a serem utilizados, acompanhamento da fertilização in vitro (FIV), criopreservação dos embriões sendo por meio da vitrificação (VIT) ou Direct Transfer ou OneEstep (DT).

A segunda etapa do estágio supervisionado, foi realizada na empresa LLD Pesquisa e Desenvolvimento em Produção Animal LTDA ME, REPRODUZA, localizada em Oliveira-MG, sob a supervisão do médico veterinário Fernando Franqueira de Melo, no período de 08 de agosto a 09 de setembro de 2022, totalizando 200 horas de atividades. Na REPRODUZA, acompanhamos as atividades que englobam os protocolos realizados nas fêmeas receptoras, assim como a definição de quais são aptas para a atividade, a aspiração folicular das doadoras, escolha do acasalamento, transferência do embrião, diagnóstico de gestação e a sexagem fetal.

Diante disso, este relatório tem como objetivo relatar as atividades executadas durante todo o período de estágio supervisionado.

## **CAPÍTULO 1**

### **1 PECPLAN ABS IMPORTAÇÃO E EXPORTAÇÃO LTDA**

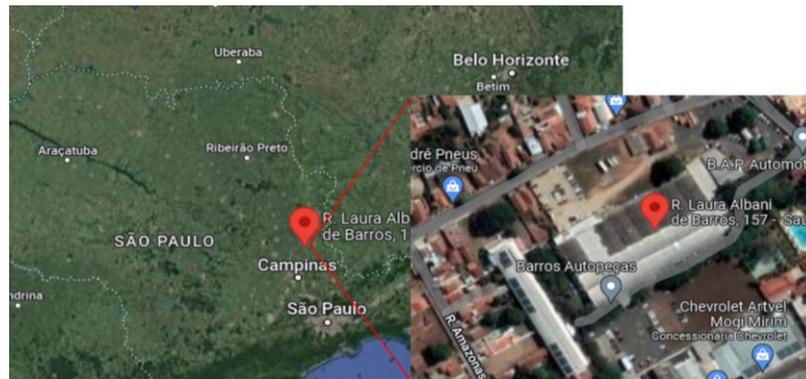
#### **1.1 Descrição do local de estágio**

A ABS é uma empresa multinacional com sede em De Forest, Wisconsin, nos Estados Unidos da América, sendo considerada a líder mundial em fornecimento de genética bovina, comercializando seus produtos em 70 países ao redor do mundo. Sua fundação ocorreu em 1941 e foi a empresa pioneira no desenvolvimento da técnica de congelamento de sêmen em palhetas, tecnologia esta, que só chegou ao Brasil em 1959 com a empresa Pecplan em conjunto com grupo Bradesco. Essas empresas realizaram, em 1970, a divulgação da técnica de IA associado ao treinamento de mão-de-obra. Em 1996 a ABS comprou a Pecplan, tornando-se a única empresa.

No Brasil a sede da Pecplan está situada em Delta, microrregião de Uberaba, Minas Gerais. Porém há representantes em todos os estados brasileiros e cinco laboratórios produzindo embriões, os quais estão localizados em Uberaba-MG, Mogi Mirim-SP, Xinguara-PA, Cuiabá-MT e Sinop-MT.

O estágio supervisionado foi realizado na unidade de Mogi Mirim-SP (FIGURA 1), a qual conta com oito técnicos, três auxiliares de laboratório, dois funcionários responsáveis exclusivamente pelo processamento do sêmen e estocagem e um supervisor do laboratório. Há ainda três pesquisadoras que ficam em um laboratório separado e um coordenador de pesquisa, duas responsáveis pelo meio, uma coordenadora de meios, um coordenador da unidade de Mogi Mirim, uma faxineira, um funcionário responsável por digitalizar todas as fichas, uma técnica responsável pela esterilização e 8 pessoas no setor administrativo.

Figura 1– Localização da filial ABS Pecplan em Mogi Mirim-SP



Google Maps

## 1.2 Instalações

A filial onde o estágio foi realizado é composta por uma sala de transição e paramentação (FIGURA 2 A e B), sala de produção *in vitro* de embriões e laboratório comercial (FIGURA 3 A e B), sala de congelamento de embriões (FIGURA 4), sala de produção de meios de cultivo (FIGURA 5), sala de produção *in vitro* de embriões e laboratório de pesquisa, uma cozinha (FIGURA 6), três salas de reuniões, sala de campo (FIGURA 7), sala de armazenagem de sêmen (FIGURA 8) e sala de esterilização. Dentro do laboratório comercial tem seis fluxos de trabalho, oito estufas. A sala de congelamento contém duas máquinas para congelamento, dois computadores, uma estufa e uma lupa.

Figura 2– Sala transição e paramentação da filial PECPLAN ABS, Mogi Mirim-SP.



Fonte: Do autor (2022)

Figura 3– Sala de produção in vitro de embriões e laboratório comercial da filial PECPLAN ABS, Mogi Mirim-SP



Fonte: Do autor (2022).

Figura 4– Sala de congelamento de embriões da filial PECPLAN ABS, Mogi Mirim-SP



Fonte: Do autor (2022).

Figura 5– Sala de produção de meios de cultivo da filial PECPLAN ABS, Mogi Mirim-SP



Fonte: Do autor (2022).

Figura 6– Cozinha da filial PECPLAN ABS, Mogi Mirim-SP



Fonte: Do autor (2022).

Figura 7– Sala de campo da filial PECPLAN ABS, Mogi Mirim-SP



Fonte: Do autor (2022).

Figura 8– Sala de sêmen da filial PECPLAN ABS, Mogi Mirim-SP



Fonte: Do autor (2022).

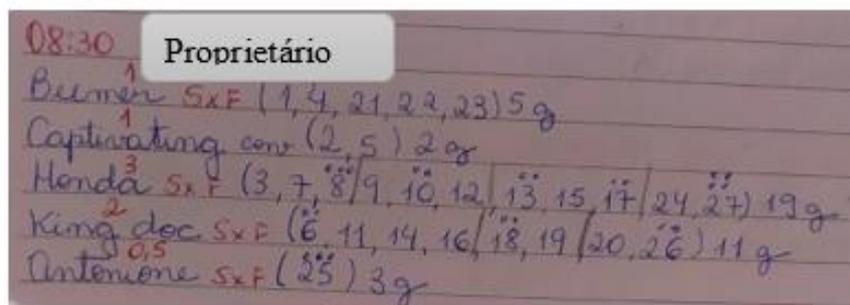
## 2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

Durante o período de estágio foram acompanhadas as atividades do laboratório de embriões comercial, sendo nossa função o preenchimento das planilhas de produção, bem como seus cálculos, confecção de placas, tubos de previsão, lacradores de palheta, organização do laboratório, conferência de estoque, auxílio na fertilização *in vitro* (FIV), cultivo *in vitro* (CIV) e preenchimento das fichas de transferência a fresco, vitrificação e Direct Transfer ou One Estep (DT).

### 2.1.1 Fertilização *in vitro*

De segunda-feira à quinta-feira, por vezes às sextas-feiras, os técnicos recebem fotografias das fichas de aspiração folicular para que possam transcrever para o caderno de FIV os acasalamentos e a quantidade de gotas por vaca, sendo que cada gota alberga no máximo 30 oócitos (FIGURA 9). Além disso, calculam a quantidade de meios e desenham as placas de FIV e CIV. O horário do início da rotina é determinado de acordo com as atividades que precisam ser executadas, sendo o horário da FIV um fator de extrema importância para essa definição. A fertilização ocorre em 22 a 24 horas depois da aspiração folicular, tempo necessário para que o oócito permaneça no meio de maturação.

Figura 9– Caderno de FIV da filial PECPLAN ABS, Mogi Mirim-SP.



Fonte: Do autor (2022).

Através da ficha recebida é possível definir o horário de início da rotina e a quantidade de placas necessárias para a produção, onde cada placa tem capacidade para 5 gotas. Para padronizar o processo foi definido que cada placa pode conter sêmen de apenas um touro facilitando a fertilização. Quando a vaca tem a produção acima disso, há necessidade de divisão dos oócitos, sendo necessário separar mais de uma gota, de acordo com a seleção realizada no campo.

A fertilização *in vitro* é realizada diariamente. A FIV se inicia com a montagem das placas uma hora antes, as quais são colocadas na estufa incubadora com temperatura de 39,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 95% de umidade. Na sequência, os técnicos passam os oócitos para a placa de FIV enquanto os estagiários fazem a conferência dos tubos de maturação (FIGURA 10) para averiguar se existe alguma oócito ainda no tubo. Em caso negativo os tubos são descartados.

Figura 10– Conferência dos tubos de maturação



Fonte: Do autor (2022).

No horário determinado da FIV, os técnicos solicitam o descongelamento no setor de sêmen e iniciam a preparação do sêmen, o qual consiste na sua lavagem com duas centrifugações, sendo a primeira com Percoll, que é composto por partículas de sílica coloidal coberto com polivinilpirrolidona, e a segunda em solução denominada TL-Sêmen.

Para centrifugação em Percoll esse coloide é preparado em concentrações distintas para que forme gradiente descontínuo de duas ou três fases (45 e 90%), sendo denominado com Percoll baixo e Percoll alto respectivamente, a fim de realizar a separação espermática, não tendo distinção ao volume da palheta de sêmen. Para isso, após descongelar a palheta, seu conteúdo é colocado em um eppendorf de 5 mL com a solução de Percoll e centrifugado a 5 minutos com rotação de 10.000 rpm, quando o sêmen é sexado, ou a 5 minutos a 9.000 rpm, no caso de sêmen convencional. Na sequência é retirado o sobrenadante (1.000 µl) e adicionado a mesma quantidade de TL-Sêmen, seguido com a segunda centrifugação, a qual era de 3 minutos a 4.000 rpm, para sêmen sexado, e 3 minutos a 2.000 rpm para o sêmen convencional.

Concluído o processo, retira-se o volume em  $\mu\text{l}$  necessários do pellet para fertilizar a produção, a qual era dependente do tipo de sêmen e quantidades de gotas da FIV. No caso do sêmen sexado o volume é determinado após multiplicar a quantidade de gotas por touro por 10 e somar esse resultado com 10, conforme exemplificado na sequência:

Touro Beemer tem 5 gotas

$$5 \times 10 = 50$$

$$50 + 10 = 60 \mu\text{l}$$

Já quando se trata de sêmen convencional a conta realizada é outra, devido ao fato da dose ser mais concentrada. Pensando nisso, o número de gotas por touro é multiplicado por 5 e soma-se 5 no resultado final, como o exemplo a seguir:

Touro Captivating tem 2 gotas

$$2 \times 5 = 10$$

$$10 + 5 = 15 \mu\text{l}$$

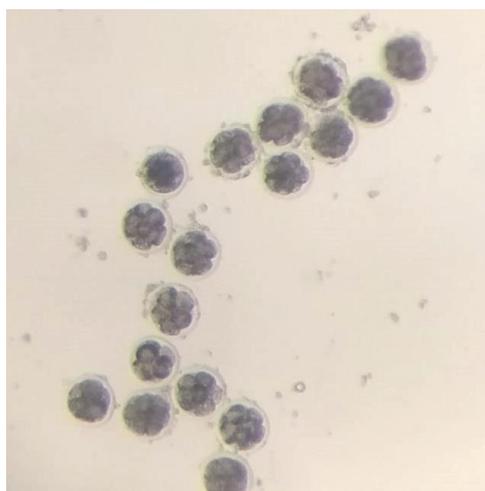
Depois das contas realizadas, retira-se a quantidade necessária do pellet que será transferido para um eppendorf de 1,6 mL vazio para a fecundação das gotas. Durante o processo de FIV não era feita a análise da concentração, era observada a motilidade e classificado pelo técnico responsável seguindo seus próprios padrões. Quando finalizado todo processo, as placas são levadas à incubadora com temperatura de  $39,5^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  em ar atmosférico e 95% de umidade por 18 a 22 horas. Entretanto, quando é uma produção das raças senepol e sindi, padronizou um tempo de cultivo de 24 horas, para facilitar o processo seguinte de desnudamento.

### **2.1.2 Cultivo in vitro (CIV)**

A fase de cultivo do embrião ocorre entre 18 e 22 horas após a realização da fertilização, porém, cerca de 24 horas antes, é realizada a montagem das placas em que o embrião permanecerá pelos próximos 6 dias. A montagem é realizada com  $100 \mu\text{L}$  do meio de cultivo in vitro, denominado como 1ª CIV e recoberta com óleo mineral. É segredo empresarial sobre os produtos que constituem o CIV, mas de acordo com o documento 175 da EMBRAPA, produzido para minicursos em 2014, os meios de CIV devem conter Synthetic Oviductal Fluid (SOF) suplementado com soro fetal bovino, albumina sérica bovina, aminoácidos, piruvato, lactato e glutamina.

Antes de transferir os presumíveis embriões para a nova placa, realiza-se o desnudamento das estruturas em uma placa petri de 90 mm contendo 3 gotas de 100  $\mu\text{L}$  do 1<sup>a</sup> CIV, onde a primeira gota contém as estruturas recém retiradas da placa de FIV. Na sequência, com o auxílio de uma pipeta de 100  $\mu\text{L}$  é realizada a lavagem das estruturas, pipetando-as por 10 vezes. Estas são passadas de gota a gota, visando remover qualquer estrutura ou sujeira que não seja o possível zigoto. Após o fim do processo, os possíveis zigotos são transferidos para a placa de 1<sup>a</sup> CIV, a qual ficará na incubadora por 48 horas até a realização do C3, onde é analisado e contado as estruturas que clivaram e retirada 50  $\mu\text{L}$  do meio e adicionado a mesma quantidade do meio 2<sup>o</sup> CIV, no qual, segundo a EMBRAPA é usado o meio SOF (IMAGEM 11).

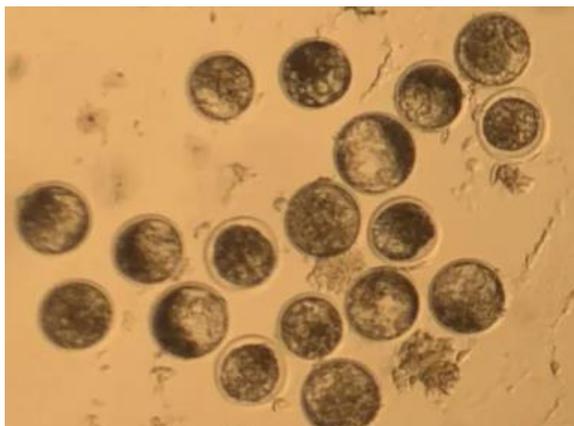
Figura 11– Estruturas clivadas



Fonte: Do autor (2022).

No sexto dia do processo, é possível fazer a previsão de quantos embriões foram produzidos. Nesse momento também é avaliado a formação do blastocisto e contado aqueles que tem chance de seguirem para transferência (IMAGEM 12). Após a contagem as estruturas são transferidas para um tubo contendo 400  $\mu\text{L}$  de H-SOF e 300  $\mu\text{L}$  de óleo mineral para a finalização de seu desenvolvimento.

Figura 12– Embriões em D6



Fonte: Laboratório Apoyar (2022).

No sétimo dia é realizada a classificação dos embriões quanto a sua morfologia embrionária, observando a expansão do blastocele (TABELA 1), selecionando os que estarão aptos para a transferência ou congelamento.

Tabela 1- Classificação dos embriões por morfologia embrionária

<b>Imagem</b>	<b>Classificação</b>	<b>Características</b>
	BI	Blastócito inicial, início da formação do blastocele
	BL	Blastócito intermediário, apresenta a mesma quantidade de massa por volume do blastocele
	BX	Blastócito expandido, volume do blastocele é maior que tamanho da massa embrionária
	BN	Blastócito em eclosão, embrião se desprende da zona pelúcida
	BE	Blastócito eclodido, embrião fora da zona pelúcida e pronto para se fixar no endométrio

Fonte: Do autor (2022).

Uma vez finalizada esta etapa, os embriões podem ser destinados para a criopreservação (DT ou VIT) ou para a transferência a fresco. A transferência a fresco é realizada para uma receptora no dia D8 com embriões todos embriões em estágio de blastócito podem ser utilizados, sendo os BN e BX, os preferenciais. Os embriões BE são evitados por poderem ficar presos na parede da palheta, e os BI, quando comparados com os demais, apresentam atraso no seu desenvolvimento. Dessa forma, os melhores resultados são obtidos com os embriões BN, BX e por vezes BL. Aqueles embriões que não são envazados são descartados.

Após a separação dos embriões, é realizado o envase em palheta com o meio de conservação TE, estes, podem ficar nas palhetas por até 24 horas, porém deve-se ter em mente que estarão em desenvolvimento durante todo tempo. Na palheta, os constituintes são distribuídos na seguinte sequência: na ponta inicial o meio TE, seguido de ar, depois embrião em uma coluna grande central com o meio TE, seguido por ar e do meio TE na extremidade final (FIGURA 15). Essa distribuição é feita para proteger o embrião, pois caso haja contaminação nas pontas, o ar dificulta que esta atinja o embrião. Para finalizar o processo é colocado um lacrador, enumerado de acordo com a ordem do envase, é anotado em uma ficha a identificação do embrião com nome e RGD (registro genealógico definitivo) dos pais, além de sua classificação, permitindo a escolha de melhor conveniência para o proprietário ou médico veterinário. As palhetas são organizadas em uma transportadora (FIGURA 16) com temperatura de 37°C ou em caixas de isopor com luvas aquecidas para manter a temperatura de 37°C. O preenchimento das fichas, o lacre das palhetas e guardar os embriões na transportadora é de responsabilidade do estagiário.

Figura 13 – Modelo de envase para TE



Fonte: Do autor (2022).

Figura 14 – Transportadora de embriões



Fonte: Do autor (2022).

A criopreservação de embriões é uma biotecnologia que conserva o embrião no estágio de blastocisto, o que permite uma maior programação do produtor quanto a data de sua transferência, além de poder ser guardado por anos. Outro benefício da criopreservação é a forma de transporte, uma vez que os embriões a fresco necessitam ser transportados em uma temperatura de 37°C e transferidos no mesmo dia, já os criopreservados não tem essa exigência e podem ser transportados de forma semelhante ao sêmen. Todos esses fatores, facilitam a venda e melhoria genética do rebanho em uma mesma geração, pois o transporte é mais simples e não há exigência de data quanto a sua produção.

A criopreservação dos embriões pode ser realizada pela metodologia do Direct Transfer (DT), a qual era realizado apenas por técnicos de nível 2, ou pela vitrificação, a qual é executada por técnicos de nível 1 e 2. Por vezes os treinees realizavam a criopreservação, mas acompanhados dos técnicos ou do supervisor de laboratório, e apenas quando o volume de trabalho era menor. Durante os procedimentos, é função do estagiário anotar nas fichas, adicionar nitrogênio nas máquinas ou no isopor, fazer os lacradores e montar as raques que serão guardadas, lacrar as palhetas, e fazer as marcações do seeding no DT.

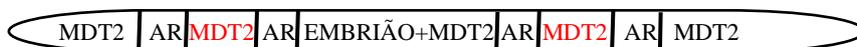
### **2.1.3 Direct Transfer ou One Step (DT)**

O Direct Transfer ou One Step é uma técnica de criopreservação lenta, na qual os embriões BX são selecionados no meio DT1 e o envase é feito em meio DT2. A disposição é realizada conforme a figura 17, intercalando o meio DT2 com ar e com o embrião disposto ao centro, envolvido com pouco meio de conservação. As regiões preenchidas por meio que estão próximas ao embrião recebem uma marcação, com o objetivo de facilitar a visualização na

próxima etapa. O embrião deve permanecer no meio DT2 por 20 minutos, devido a isso o processo de envase se inicia e todos embriões selecionados devem ser envasados nesse período de tempo.

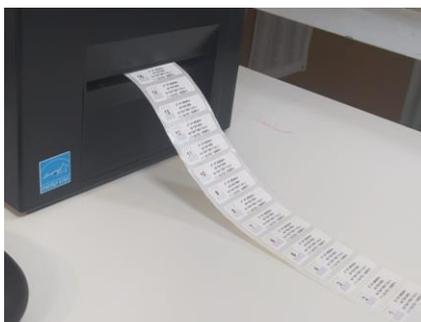
Em cada palheta é colocada apenas um embrião e são feitos lacradores individualizados, contendo o número de inspeção do MAPA (Ministério da Agricultura e Pecuária), o número do embrião, o acasalamento e grau de sangue quando se trata da raça girolanda. O estagiário realiza a confecção dos adesivos dos lacradores (FIGURA 18) e o preenchimento da ficha que contém a quantidade de embrião e quantas raques foram necessárias para guardar as palhetas dos embriões congelados.

Figura 15 – Modelo de palheta de DT



Fonte: Do autor (2022).

Figura 16 – Impressão dos adesivos do DT



Fonte: Do autor (2022).

Os embriões envasados eram então submetidos a curva de resfriamento, inicialmente o nitrogênio é colocado na máquina de congelamento, e, após a temperatura estabilizar para  $-7^{\circ}\text{C}$ , seguia-se com a colocação das palhetas. Dois minutos após, inicia-se o seeding, que consiste no início do congelamento, realizado com o auxílio de uma haste flexível banhada em nitrogênio, colocada em contato com as marcações prévias nas paletas. Na sequência, inicia-se a curva gradual de resfriamento controlado, que, dependendo da máquina, baixa a temperatura de  $0,3$  a  $0,5^{\circ}$  a cada minuto, até alcançar a temperatura final de  $-37^{\circ}\text{C}$ , após é colocado as palhetas em contato direto com o nitrogênio e armazenados nas raques e encaminhados para o estoque. Para que não ocorra significativa formação de cristais de gelo no interior das células o resfriamento deve ser controlado para que ocorra a desidratação gradual e completa da matriz intracelular.

### **2.1.4 Vitriificação (VIT)**

A vitriificação é o congelamento rápido, que promove a desidratação do embrião seguido da diminuição drástica da temperatura, evitando desta forma, a formação de cristais de gelo no interior das células. Esta é realizada pela técnica “open pulled straw” (OPS), que consiste em uma permanência de 30 segundos do embrião com crioprotetores, que na sequência é colocado em contato direto com nitrogênio, sendo que essa mudança busca de temperatura evita injúrias nas células pelo frio, danos tóxicos e osmóticos.

Para realização da técnica é necessário uma caixa de isopor contendo nitrogênio para realização do congelamento rápido, sendo utilizada uma palheta cortada em forma de bisel. Para isso, embriões selecionados em BX eram lavados com meio de SOF enriquecido por SFB, e depois colocados em um meio com 7,5% de etilenoglicol (EG) e 7,5% de DMSO por 3 minutos. Após esse tempo, os embriões são transferidos para uma outra gota com o meio de 16,5% de EG e 16,5% de DMSO por 30 segundos, envasados em até 5 embriões em uma OPS, antes do término dos 30 segundos. A OPS contendo os embriões são levados em contato com o nitrogênio disposto na caixa de isopor.

## **3 Análise das categorias por embriões produzidos no ano fiscal Pecplan ABS**

O ano fiscal está relacionado com as contas das empresas, as quais realizam a avaliação financeira e produção geral.

Na sequência faremos uma breve revisão de literatura sobre os fatores que influenciam a qualidade dos oócitos e conseqüentemente a produção de embriões, seguido da análise dos dados da produção de embriões por categorias do ano fiscal de 2021 da Pecplan ABS, referente ao período de 01 junho 2021 a 31 maio de 2022.

### **3.1 Produção de embrião por categoria de animais**

#### **3.1.1 Revisão de literatura**

A produção in vitro de embriões (PIV) é uma técnica que possibilita maiores ganhos genéticos quando comparado a outras técnicas como inseminação artificial (IA), inseminação

artificial em tempo fixo (IATF), superovulação e monta natural, uma vez que na PIV a produção de bezerro por ano é maior (RUMPF, 2007). Além disso, as fêmeas podem gerar prole por toda vida, desde a idade infantil até a idade senil (DAYAN et al., 2000), desde que apresentem reserva folicular. Outro benefício da técnica é o maior ganho genético devido a diminuição do intervalo de tempo entre gerações, pois permite a utilização de oócitos de bezerras (TANEJA et al., 2000).

Os oócitos para a PIV são adquiridos mediante aspiração folicular dos ovários de fêmeas doadoras realizados pela técnica de coleta transvaginal guiada por ultrassom, do inglês Ovum pick-up (OPU) ou aspiração folicular. Porém antes da realização da OPU, a extração dos oócitos era realizada através de laparotomia ventral mediante realização da superovulação ou pela coleta post mortem mediante punção folicular (WANI et al, 2000).

A técnica OPU se consolidou devido aos benefícios que apresenta, sendo menos invasiva que as demais, possibilita a aspiração de fêmeas com 6 meses de idade, com até 3 meses de gestação e a partir de 3 semanas no pós-parto (VIANA; BOLS, 2005). Outra vantagem é a não exigência da utilização de hormônios e a possibilidade de refazer todo processo em até 15 dias, além deste método se mostrar mais eficiente e lucrativo quando comparado com o método da superovulação (VARAGO, 2008)

Apesar da possibilidade de realizar a OPU em todas as categorias, algumas variáveis podem influenciar na qualidade dos oócitos e conseqüentemente na produção de embriões, como a raça das doadoras (GIMENES et al., 2015), a dieta utilizada (BARUSELLI et al., 2016), o estresse térmico, o estado fisiológico como a lactação (FERREIRA et al., 2016) e a idade do animal (GIORGIO, 1997).

Quando se compara as raças *Bos taurus* e *Bos indicus*, observa-se que as fêmeas *Bos indicus* apresenta três ondas foliculares e *Bos tauros* duas ondas foliculares (BARUSELI et al., 2007). Batista et al. (2014) afirmam que a raça *Bos indicus* apresenta mais oócitos viáveis para a CIV devido à maior quantidade de folículos antrais quando comparado com *Bos taurus*. Desta forma, é importante ter consciência das diferenças fisiológicas raciais para realização da OPU e PIV, sendo possível prever a probabilidade de produção de embriões para cada aspiração realizada.

A dieta fornecida para as doadoras é algo a ser observado, pois a concentração de insulina está associada à qualidade dos oócitos (BARUSELLI et al., 2016). A insulina é um

hormônio envolvido na regulação da concentração da glicose sanguínea (FOULADI-NASHTA & CAMPBELL, 2006) e nos ovários atua como moduladora folicular, aumentando a quantidade de folículos primários e diminuindo a atresia folicular (ALMEIDA et al., 2001). Diskin et al. (2003) comprovou que animais com restrição alimentar apresentam menor produção de hormônios sexuais o que compromete a produção de receptores do hormônio luteinizante (LH), que por sua vez são influenciados pela presença da insulina. Batista et al. (2020) relatou que animais com dieta rica em matéria seca apresentam maior liberação de insulina e em consequência apresentam um aumento da taxa de crescimento folicular e da concentração de LH. Porém, dieta com excesso de energia e consequentemente alta concentração de insulina, principalmente para animais em final de lactação, os quais são predispostos a resistência à insulina, pode levar a baixa qualidade de oócitos (BARUSELLI et al., 2016).

O estresse térmico é outro fator de influência na vida reprodutiva dos animais, pois quando não há homeostasia, a fertilidade é reduzida (LIMA et al., 2013). Roth (2000) relatou que o estresse por calor causa depressão na dominância folicular pois aumento cortisol e causa diminuição da inibina e aumento do hormônio folículo estimulante (FSH), que em excesso altera a dinâmica folicular. Segundo Leite da Silva et al (2020), animais criados no sistema lavoura-pecuária-floresta apresentam maior produção de embriões *in vitro*, devido a homeostasia que este sistema produz para os animais. Desta forma, sabendo-se que o estresse por calor tem grandes influências sobre a qualidade dos oócitos, deve-se proporcionar o conforto térmico para as doadoras, visando maximizar sua produção (OLIVEIRA et al.; 2011).

Quando é feita a análise de acordo com o estado fisiológico, observa-se que animais não lactantes apresentam melhor resposta quando comparados a animais pré-púbere, novilhas e vacas lactantes (GUERREIRO et al., 2014). Isso ocorre porque a vaca em lactação vazias apresenta uma queda na progesterona (P4) e estradiol (E<sub>2</sub>) o que compromete a qualidade dos oócitos e consequentemente sua fertilidade (BRITT 1992; LEROY et al., 2011). Além disso, esses animais são mais suscetíveis ao estresse térmico pela alta produção de calor metabólico (WEST, 2003), uma vez que sua dieta é mais rica em energia quando comparada a das vacas não lactantes. Além disso, esse excesso de energia pode comprometer o desenvolvimento dos oócitos (ADAMIAK, et al, 2005).

Ao analisar o fator idade, observa-se que a qualidade dos oócitos aumenta com o avanço da idade, com exceção a animais senis. Segundo Giorgio (1997), bezerras com 5 a 7 meses de idade apresentam menor qualidade de clivagem quando comparado aos animais adultos e com

melhora significativa da qualidade aos 9 meses, porém a taxa de clivagem só foi semelhante ao das adultas aos 11 meses de idade. Já Snel-Oliveira et al. (2003) observou que a quantidade de oócitos recuperados em animais de 10 meses é semelhante à de adultos, indicando a aspiração a partir de 10 meses de idade.

### 3.1.2 Análise dos dados

Após o fechamento do ano fiscal na empresa PECPLAN ABS, filial Mogi-Mirim, foi realizado a coleta e análise dos dados referente as seguintes categorias de fêmeas: bezerra, novilhas, vaca lactante e vaca secas. Os dados coletados foram referentes a produção total de embriões, a média de produção e embriões por doadora. Os cálculos foram realizados no programa Excel e repassados para discussão no presente trabalho.

O dado, produção total de embriões, foi coletado mediante o somatório de embriões produzidos por cada doadora em sua categoria. Já a média de produção foi realizada através da divisão da quantidade de embriões produzidos por número de oócitos coletados. Para calcular a produção de embriões por doadora, dividiu-se a quantidade de embriões pelo número de doadoras. Vale salientar que a produção total da empresa foi superior aos dados apresentados, pois não foram incluídas na análise as fichas/anotações sem a definição correta das categorias de animais.

Tabela 2- Tabela das análises da produção de embriões no ano fiscal de 2021 obtidos na PECPLAN ABS, filial Mogi-Mirim.

<b>Categoria</b>	<b>Total de embriões</b>	<b>Média por produção</b>	<b>Embriões por doadora</b>
Bezerra	129	16%	4,6
Novilhas	10.312	22%	5,5
Vacas lactantes	14.221	24%	4,86
Vaca seca	56.663	30%	6,58

Fonte: Do autor (2022).

Ao observar a tabela é possível constatar que a produção de embriões em bezerras, no período de um ano, foi inferior ao das demais categorias. Esses resultados já eram esperados, uma vez que os produtores já sabem da baixa produção de embriões em bezerras, preferindo realizar a OPU em animais mais velhos. Os demais dados também se apresentaram inferiores, com a média de produção de 16% e de 4,6 embriões produzido por doadora. Esses dados corroboram com os achados de WARZYCH et al. (2017), o qual verificou que a produção de

blastócitos de bezerras é menor quando comparada as demais categorias, justificado pelo menor diâmetro dos folículos e baixo teor de proteína citoplasmática.

A produção média de produção de novilhas foi semelhante as de vaca lactante, porém a quantidade de embriões por doadora foi superior. Isso ocorre pelo fato de que as novilhas produzem mais oócitos viáveis quando comparado com vacas lactantes, porém a formação de blastócito é menor (BARUSELLI, 2016).

Os animais lactantes apresentaram a segunda maior média de produção, porém a quantidade de embriões por doadora é menor que de novilha e vaca secas. A menor produção de hormônios na lactação compromete a qualidade dos oócitos e consequentemente a qualidade dos embriões (WALSH et al., 2011).

Quando comparamos vacas secas com as demais, observamos que é a categoria que tem maior média de produção e maior produção de embriões por doadora. Vacas lactantes tem maior exigência metabólica e consequente diminuição da fertilidade (WALSH et al., 2011), o que pode justificar uma redução na média de produção. Esses achados são semelhantes os descritos por VIEIRA et al. (2014) e BARUSELLI (2016), em que vacas não lactantes produziram mais embriões aptos a transferência quando comparado com animais em lactação, novilhas púberes ou pré-púberes.

Portanto, os resultados demonstram que vacas não lactantes são doadoras mais eficientes para a PIV, por apresentarem um maior rendimento de embriões, uma maior média e maior conversão de embrião por doadora. Apesar da aspiração de oócitos de bezerras ser indicada para promover maiores ganhos genéticos, deve-se levar em consideração a baixa produção desta categoria no cálculo da média de oócitos selecionados para a quantidade de embrião desejados.

## **CAPÍTULO 2**

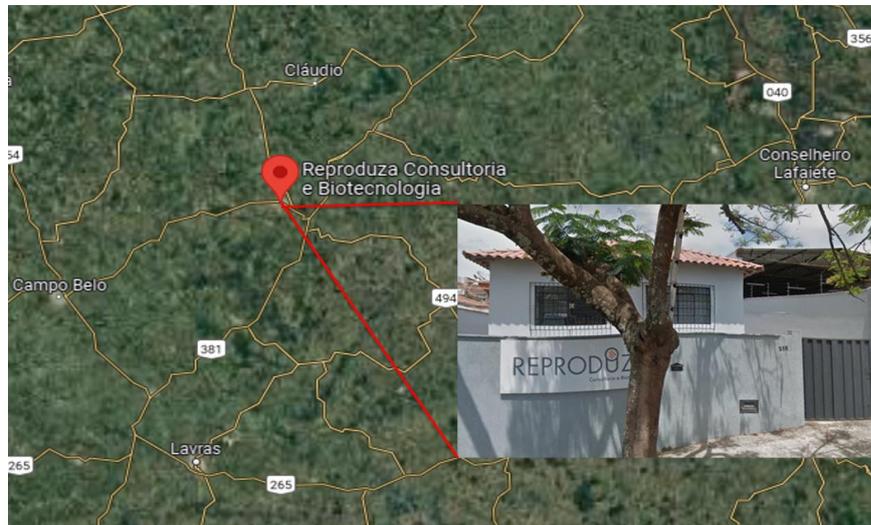
### **1 LLD Pesquisa e Desenvolvimento em Produção Animal LTDA ME, REPRODUZA**

#### **1.1 Descrição do local de estágio**

A empresa Pesquisa e Desenvolvimento em Produção Animal, fundada em 2013, tem como sede a cidade de Oliveira - MG, porém atua como prestadora de serviço nas regiões Central, Centro-Oeste, Alto Paranaíba, Sul e Norte de Minas Gerais. A equipe de trabalho do laboratório de produção *in vitro* (FIGURA 19) é constituída por uma técnica de laboratório, três

veterinários de campo (sendo um aspirador de folículos e dois transferidores de embriões), um técnico de laboratório, um selecionador de oócitos e duas pessoas no setor administrativo.

Figura 17 – Localização da empresa REPRODUZA em Oliveira- MG.

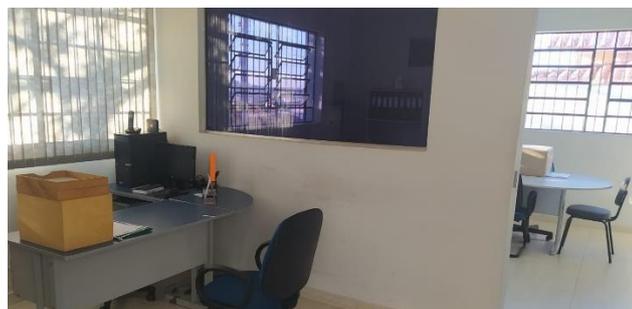


Fonte: Google Maps

## 1.2 Instalações

As instalações da REPRODUZA possuem uma sala de recepção (FIGURA 20), cozinha (FIGURA 21), uma sala da administração que também é a sala de reunião (FIGURA 22), sala de preparação em conjunto com estoque de sêmen (FIGURA 23), um laboratório de FIV, que contém um fluxo laminar e duas incubadoras (FIGURA 24) e uma sala de estoque de material de campo (FIGURA 25).

Figura 18 – Sala de recepção da empresa REPRODUZA em Oliveira- MG



Fonte: Do autor (2022).

Figura 19 – Cozinha da empresa REPRODUZA em Oliveira- MG.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 20 – Administração e sala de reuniões da REPRODUZA em Oliveira- MG.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 21 – Sala de preparação e estoque de sêmen da REPRODUZA em Oliveira- MG.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 22 – Laboratório de FIV da REPRODUZA em Oliveira- MG.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 23 – Sala de material do campo da REPRODUZA em Oliveira- MG.



Fonte: Do autor (2022).

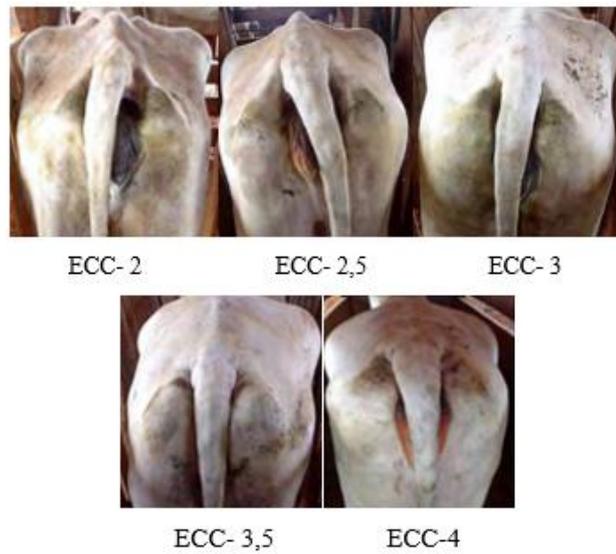
## 2 Atividades desenvolvidas

Durante o período de estágio, foram acompanhadas as atividades do laboratório de embriões com a rotina e afazeres semelhantes aos desenvolvidos na PECPLAN ABS, porém nesta empresa era permitido a participação efetiva do estagiário em todo o processo da produção, por vezes executando o serviço sob a supervisão da técnica. Além disso, participamos das atividades a campo, observando a aspiração folicular, bem como a seleção dos oócitos, seleção das receptoras quanto ao escore corporal e avaliação dos ovários quanto a resposta do protocolo. Algumas vezes executando estas atividades. Também foi acompanhado o diagnóstico de gestação, sexagem e a transferência de embriões. Em todo processo, era função do estagiário auxiliar na montagem dos equipamentos e anotações nas fichas.

### 2.1.1 Protocolo em receptora

Na fase inicial da produção de embriões em uma fazenda, ocorre a seleção das receptoras 18 dias antes da data da transferência, primeiramente pelo proprietário e depois pelo veterinário que avalia o escore de condição corporal (ECC) (FIGURA 26), útero e ovários das selecionadas. Essa avaliação é importante tendo em vista que ECC abaixo do ideal reduz a fertilidade devido ao comprometimento da dinâmica folicular. O ECC ideal para obtenção de melhores resultados reprodutivos é de 3 a 4, caracterizado por uma boa condição física e deposição de gordura desejável. A figura 27 demonstra as novilhas que não foram selecionadas e na figura 28 as selecionadas como receptoras.

Figura 24- Escore de condição corporal



Fonte: Maciel (2006).

Figura 25- Animais não selecionados para protocolo de receptora



Fonte: Do autor (2022).

Figura 26- Animais selecionados para protocolo de receptoras

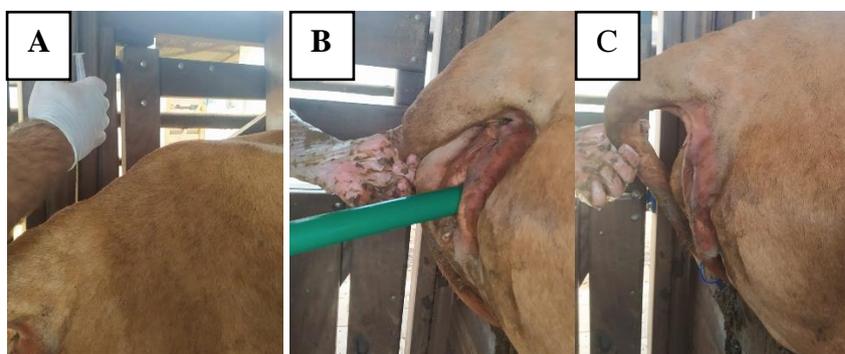


Fonte: Do autor (2022).

Eram descartadas do protocolo, as fêmeas com CL (corpo lúteo) e que pudessem ter tido contato com macho, pois poderiam estar prenhas e as com pouco tempo de paridas, com ovários estacionários sem qualquer indício de resposta. Ao analisar cada animal individualmente, era feito o protocolo naqueles que se mostram aptos a responde-lo.

O protocolo para receptoras inicia-se com a administração de 2 mL de Benzoato de estradiol, via intramuscular e com o implante de progesterona (P4) (FIGURA 29 A, B, C). Após 8 dias o proprietário retira o P4 e aplica 0,5 mL de Cipionato de estradiol em vacas e 0,3 mL em novilhas, 2 mL de Gonadotrofina coriônica equina (eCG) para vacas e 1,5 mL para novilhas, 2 ml de Cloprostenol para vacas e 1,5 mL para novilhas. É função do estagiário realizar a anotação dos brincos dos animais, montagem do implante e a preparação da dose do medicamento, por vezes é permitido que faça avaliação, bem como todo processo do protocolo.

Figura 27- Início do protocolo com uma dose de 2 mL de Benzoato de estradiol (A) e implante de P4 (B e C)



Fonte: Do autor (2022).

### 2.1.2 Aspiração folicular (OPU)

As doadoras são selecionadas pelos proprietários de acordo com a genética do animal seguido da avaliação pelo veterinário da qualidade dos folículos, mediante exame ultrassonográfico. O processo de aspiração inicia-se 8 dias antes da data programada para transferência e 9 dias depois do início do protocolo. O primeiro passo é a montagem do equipamento (FIGURA 30), seguido da limpeza da vulva com água, sabão neutro e secagem com papel toalha. É realizado uma anestesia epidural com lidocaína na articulação sacro caudal, visando evitar traumas no animal e diminuir os movimentos peristálticos. Quando o animal já está sob efeito do medicamento é introduzido na vulva um transdutor micro convexo com uma agulha de 18 G acoplada a uma linha de aspiração e bomba a vácuo. O veterinário guia os

ovários com a mão esquerda, via reto, até a probe e com a imagem no ultrassom realiza a aspiração dos folículos existentes.

Após a aspiração ser realizada, o material aspirado é levado até o selecionador que se encontra em uma sala fechada, com pouca luz, limpa, onde é montado a lupa, mesa aquecida e um aquecedor de tubos em banho maria para manter os oócitos a temperatura de 37°C (FIGURA 31). Ao receber o material, o rastreador faz a lavagem do material com auxílio de um filtro em uma solução de Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS), que é a solução tampão salina fosfato modificado, sem cálcio, sem magnésio e sem bicarbonato de sódio. Esta permite a visualização de quantos oócitos foram aspirados. Após selecionar os oócitos viáveis, avaliando a coloração do núcleo e a presença de células do cumulus (FIGURA 32), estes são colocados em um tubo com meio de maturação, sendo que cada tubo deve conter no máximo 30 oócitos. Ao final, os oócitos são encaminhados ao laboratório para iniciar a produção de embriões.

Figura 28 – Material para OPU.



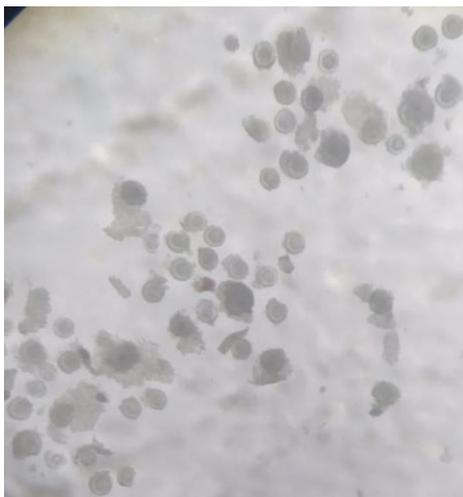
Fonte: Do autor (2022).

Figura 29 – Material para selecionar oócitos.



Fonte: Do autor (2022).

Figura 30 – Oócitos selecionados.



Fonte: Do autor (2022).

#### **2.1.4 Laboratório de embriões**

As atividades desenvolvidas no laboratório de produção de embriões da REPRODUZA são semelhantes as descritas anteriormente na empresa PECPLAN ABS, porém com pequenas diferenças quanto ao meio utilizado. Na Reproduza utiliza-se todos meios referentes a produção de embriões confeccionados pela empresa Cenatte, sendo necessário a adição de soro fetal bovino e outras substâncias não reveladas pelo laboratório de meios, antes de sua utilização e com validade de apenas 15 dias. Como na ABS, a empresa Cenatte não revela sua composição e cada frasco vem etiquetado com uma letra do alfabeto.

Além disso, outra diferença observada foi a rotação utilizada para lavagem do sêmen, sendo que não há diferenciação quando a categoria do sêmen, sexado ou convencional, sendo que em ambos a primeira rotação é de 5 minutos a 5.000 rpm e a segunda com 3 minutos a 5.000 rpm. Não foi observado diferença na qualidade do sêmen com essa mudança e em ambos os preparados há uma boa resposta na produção.

#### **2.1.5 Transferência de embriões**

A transferência de embriões (TE) ocorre oito dias após a aspiração folicular, no D7 de vida do embrião, momento em que estará na fase de blastócito e apto para ser implantado no útero. Antes de iniciar a transferência, é feita a montagem dos equipamentos, onde coloca-se uma toalha envolvida com plástico em cima da mesa. para forrar e evitar possíveis

contaminações, seguido da limpeza da toalha e dos inovuladores com álcool 70%, os quais são colocados na transportadora para seu aquecimento. Em uma luva de palpação limpa é armazenado as bainhas envolvidas com a camisas higiênicas, visando facilitar o trabalho durante a TE (FIGURA 33).

O veterinário realiza uma nova avaliação nos animais protocolados, para identificação dos que apresentaram cio e a presença de um corpo lúteo (CL). Isso ocorre devido ao fato de que quando o animal apresenta cio, 12 horas após o folículo se rompe e da origem a uma nova estrutura denominada corpo lúteo que secreta progesterona, hormônio responsável pela manutenção da gestação.

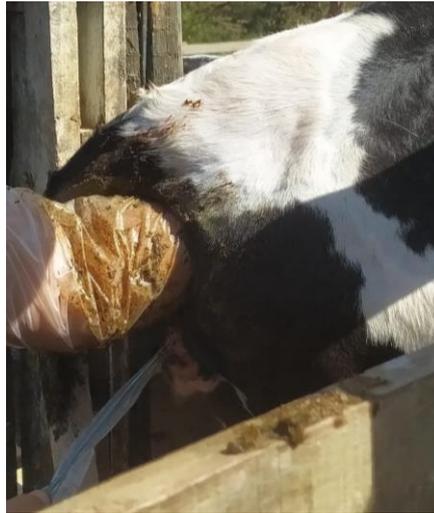
Após a verificação que receptora está apta para a transferência, ou seja, que apresenta CL no ovário, o veterinário realiza a anestesia epidural, feita no espaço sacrococcígeo com lidocaína. Durante o processo, é de escolha do produtor qual o cruzamento de maior interesse, sendo esses são transferidos primeiro. A transferência é feita no corno ipsilateral ao CL (FIGURA 34). O estagiário é responsável pelas anotações de qual embrião foi implantado e em qual receptora e pela montagem dos equipamentos.

Figura 31 - Equipamento de transferência de embrião



Fonte: Do autor (2022).

Figura 32- Realização da transferência de embrião

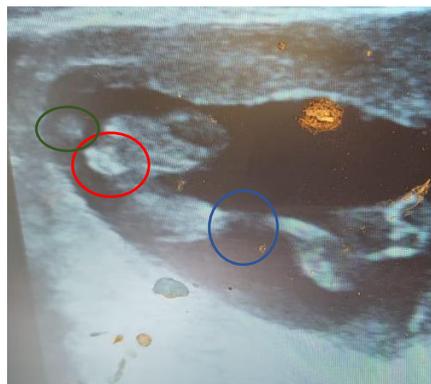


Fonte: Do autor (2022).

### 2.1.6 Diagnóstico de gestação e sexagem

O diagnóstico de gestação era realizado mediante o uso de ultrassom, e ocorria 35 dias depois após a transferência do embrião, onde as vacas não gestantes são protocoladas. A sexagem ocorre cerca de 60 dias depois da transferência, podendo ser realizada com 55 dias. Nesta é avaliado a presença e posição do tubérculo genital, sendo que nos machos o tubérculo localiza-se na região retro umbilical e já nas fêmeas caudal aos membros posteriores e abaixo da cauda. A sexagem é importante não só apenas para saber o sexo do feto, mas também para identificar que não houve absorção fetal. A figura 35 demonstra o tubérculo circulado na cor vermelha, a cauda em verde e o cordão umbilical em azul. O estagiário faz as anotações pertinentes ao processo e por vezes realiza o exame.

Figura 33- Sexagem de fêmea realizada com 65 dias de vida do feto



Fonte: Do autor (2022)

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O estágio supervisionado obrigatório é de extrema importância para o graduando em Medicina Veterinária, pois permite que este obtenha novos conhecimentos práticos e que conviva com a realidade do mercado de trabalho, além da oportunidade de colocar em prática o conhecimento adquirido durante a graduação. A realização do estágio supervisionado deu oportunidade ao graduando de acompanhar a rotina de trabalho de dois laboratórios renomados de FIV, bem como conhecer de perto todo o processo necessário para produção de embriões, desde a aspiração, preparação das receptoras à transferência e confirmação de gestação. Essa experiência a campo e laboratorial adquirida pelo graduando, proporcionou uma maior compreensão da cadeia produtiva.

Portanto, os estágios realizados na PECPLAN ABS e na REPRODUZA contribuíram para formação pessoal e profissional, preparando o aluno para o mercado de trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ADAMIAK, S. J., MACKIE, K., WATT, R. G., WEBB, R., SINCLAIR, K. D. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 5, pág. 918-926, 2005.
- ALMEIDA, F. R., MAO, J., NOVAK, S., COSGROVE, J. R., FOXCROFT, G. R. Effects of different patterns of feed restriction and insulin treatment during the luteal phase on reproductive, metabolic, and endocrine parameters in cyclic gilts. **Journal of animal science**, v. 79, n. 1, p. 200-212, 2001.
- BARUSELLI, P. S., VIEIRA, L. M., SÁ FILHO, M. F., MINGOTI, R. D., FERREIRA, R. M., CHIARATTI, M. R., OLIVEIRA L.H., VENDAS J.N., SARTORI, R. Associations of insulin resistance later in lactation on fertility of dairy cows. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 263-269, 2016.
- BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, pág. 205-211, 2007.
- BATISTA, E. O. S., MACEDO, G. G., SALA, R.V., ORTOLAN, M. D. D. V., SÁ FILHO, M. F., DEL VALLE, T. A., JESUS, E. F., LOPES, R. N. V. R., RENNÓ, F. P., BAROSELLI, P.S. Plasma anti mullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 3, p. 448-452, 2014.
- BATISTA, E., O. S., SALA R. V., ORTOLAN, M. D. D. V., JESUS, E. F., DEL VALLE, T. A., RENNÓ, F. P., MACABELLI, C. H., CHIARATTI, M. R., SOUZA, A. H., BARUSELLI, P. S. Hepatic mRNA expression of enzymes associated with progesterone metabolism and its impact on ovarian and endocrine responses in Nelore (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) heifers with differing feed intakes. **Theriogenology**, v. 143, p. 113-122, 2020.
- BRITT, J. H. Impacts of Early Postpartum Metabolism on Follicular Development and Fertility. **Bovine Proceedings**, v. 24, p. 39-43, 1992.
- DAYAN, A., WATANABE, M. R., WATANABE, Y. F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FI. **Arquivos da Faculdade Veterinária**, v. 28, p. 181-185, 2000.

DISKIN, M. G., MACKEY, D. R., ROCHE, J. F., SREENAN, J. M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 3-4, p. 345-370, 2003.

FERREIRA, R. M., CHIARATTI, M. R., MACABELLI, C. H., RODRIGUES, C. A., FERRAZ, M. L., WATANABE, Y. F., SMITH, L. C., MEIRELLES, F. V., BARUSELLI, P. S. The Infertility of Repeat-Breeder Cows During Summer Is Associated with Decreased Mitochondrial DNA and Increased Expression of Mitochondrial and Apoptotic Genes in Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 3, p. 66, 1-10, 2016.

FOULADI-NASHTA, A. A., CAMPBELL, K. H. S. Dissociation of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation by the addition of insulin in cultured bovine antral follicles. **Reproduction**, v. 131, n. 3, p. 449-460, 2006.

GUERREIRO, B. M.; RODRIGUES, C. A.; CASTRO NETO, A.; SILVEIRA, C. R. A.; VIEIRA, L. M.; OLIVEIRA, R. C.; FREITAS, B. G.; BARUSELLI, P. S. Prepubertal Holstein heifers have low efficiency when submitted to ovum pick-up and in vitro embryo production. **Animal Reproduction**, v. 11, n. 3, p. 405-405, 2014.

JOLLY, P. D., MCDOUGALL, S., FITZPATRICK, L. A., MACMILLAN, K. L. Physiological effects of undernutrition on postpartum. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 49, p. 477-492, 1995.

LEITE DA SILVA, W. A., POEHLAND, R., CARVALHO DE OLIVEIRA, C., RIBEIRO FERREIRA, M. G. C., GARCIA DE ALMEIDA, R., CÁCERES, M. B. S., DE ANDRADE MELO-STERZA, F. Shading effect on physiological parameters and in vitro embryo production of tropical adapted Nellore heifers in integrated crop-livestock-forest systems. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 5, p. 2273-2281, 2020.

LEROY, J. L. M. R.; RIZOS, D.; STURMEY, R.; BOSSAERT, P.; GUTIERREZ ADAN, A.; HOECK, V. VAN; VALCKX, S.; BOLS, P. E. J. Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolism and oocyte quality: a focus on dairy cow fertility. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 1-12, 2011.

LIMA, R. S. D., ASSUMPCÃO, M. E. O., VISINTIN, J. A., & LOPES, F. F. D. P. Alterações celulares induzidas pelo estresse térmico em embriões bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, p. 257-264, 2013.

MACIEL, A.B. de B. **Proposta de avaliação da condição corporal em vacas holandesas e nelores**. 2006. 103 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

OLIVEIRA, CLARA SLADE; SERAPIÃO, R. V.; QUINTÃO, CAROLINA CAPOBIANGO ROMANO. 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. **Embrapa Gado de Leite-Documentos (INFOTECA-E)**, 2014.

OLIVEIRA, M. D. S., TIBURCIO, M., & FERREIRA, S. G. C. Influência do estresse térmico sobre a reprodução de bovinos de corte. **EVENTOS EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica VII EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica**. 2011

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 229-233, 2007.

SNEL-OLIVEIRA, M. V., PEREIRA, D. C., MALAGOLI JUNIOR, D., RUMPF, R. Estimulação hormonal, punção folicular transvaginal e avaliação ovocitária em bezerras pré-púberes da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 106-114, 2003.

TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; VELDE, V. Development Competence Juvenile Calf Oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal, variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 1, p. 206-213, 2000.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, pág. 100-109, 2008.

VIANA, J. H. M.; BOLS, P. E. J. VIANA J.H.M. & BOLS, P.E.J. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus-oócito por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. Suplemento 1, 2005.

WANI, N. A., WANI, G. M., KHAN, M. Z., SALAHUDIN, S. Effect of oocyte harvesting techniques on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 36, n. 1, p. 63-67, 2000.

WARZYCH E, PAWLAK P, PSZCZOŁA M, CIEŚLAK A, LECHNIAK D. Prepubertal Heifers versus cows-The differences in the follicular environment. **Theriogenology**. v. 87, p. 36-47, 2017.

WestWEST, J. W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 6, p. 2131-2144, 2003.