



# **CENTRO UNIVERSITÁRIO LUTERANO DE PALMAS**

*Recredenciado pela Portaria Ministerial nº 1.162, de 13/10/16, D.O.U. nº 198, de 14/10/2016*

*AELBRA EDUCAÇÃO SUPERIOR - GRADUAÇÃO E PÓS-GRADUAÇÃO S.A.*

Itamar Rodrigues Toledo

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE MINI VACAS: relato de caso

Palmas – TO

2019

Itamar Rodrigues Toledo

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE MINI VACAS: relato de caso

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) elaborado e apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientador: Profa. Dra. Ana Luiza Silva  
Guimarães

Palmas – TO

2019



# CENTRO UNIVERSITÁRIO LUTERANO DE PALMAS

Recredenciado pela Portaria Ministerial nº 1.162, de 13/10/16, D.O.U. nº 198, de 14/10/2016  
AELBRA EDUCAÇÃO SUPERIOR - GRADUAÇÃO E PÓS-GRADUAÇÃO S.A.

## CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

### ATA DE DEFESA DO TCC

Em 13/12/2019 o(a) acadêmico(a) **Itamar Rodrigues Toledo**, matriculado(a) no curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário Luterano de Palmas, defendeu seu trabalho referente à disciplina de TCC, com o título **PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES DE MINI VACAS - relato de caso**, obtido  aprovação  reprovação com a nota 6,9 na defesa final. Esta nota está condicionada às correções solicitadas pela banca e a entrega da versão final da monografia, que deverá conter as alterações indicadas abaixo:

Corrigir os erros ortográficos e de expressão


Adequar o trabalho às normas da ABNT

Realizar alterações sugeridas pela banca contidas nos relatórios

Outros requisitos: \_\_\_\_\_

A aprovação está condicionada ao processo a seguir: após a aprovação das correções pelo(a) orientador(a), o(a) aluno(a) deverá enviar duas cópias digitais da monografia, sendo uma em formato pdf e outra em formato word, contendo sua respectiva ficha catalográfica, para o e-mail [estagiotccvet@ceulp.edu.br](mailto:estagiotccvet@ceulp.edu.br) até uma semana após a defesa. Caso o(a) aluno(a) não envie a versão final da monografia nos dois (2) formatos solicitados até a data acima definida, estará automaticamente reprovado(a) na disciplina.

#### Membros da Banca Examinadora

  
Professor(a) Orientador(a) e Presidente da Banca: **Ana Luiza Silva Guimarães**

  
Avaliador(a): **Josemara Silva Santos**

  
Avaliador(a): **Guilherme Augusto Motta**

  
Acadêmico(a): **Itamar Rodrigues Toledo**

*À Deus e a minha família, meus alicerces  
E aos animais que despertaram em mim a paixão pela criação*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela honra de ter conhecido pessoas maravilhosas que contribuíram com a minha vida acadêmica e pessoal.

Aos meus pais, Itamar Toledo Vilella e Elvira Aparecida Rodrigues, por me apoiar em todas minhas ideias, pela força, determinação e honestidade que transmitiram a mim. Vocês são meu exemplo, meu espelho, minha vida e pela graça de Deus e luta incansável me proporcionaram a realização de um sonho.

A minha irmã Celia Rodrigues Toledo, e minha sobrinha Mellyna por dar só orgulho para tio.

Agradeço minha querida amiga Adriana Polito pela amizade sincera desde o primeiro dia de aula, da faculdade para a vida inteira.

A Ghabryella Lavratti Mascarenhas, minha querida amiga que pude contar em todas as horas. Ao meu Amigo Nilson Junior pelos conselhos, ao meu amigo e compadre Anderson Silva mais conhecido como baiano.

À minha querida amiga Luciene Soares de Marchi pelo exemplo de sabedoria, ao meu amigo Jean Douglas de Paula, mais conhecido como “cumpade”, pelos momentos de risadas e descontrações.

A todos que eu considero como amigos, são muitos e se eu fosse citar todos o texto de conclusão de curso teria mais de cem páginas. A todos minha mais profunda gratidão e saudade de momentos incríveis juntos.

Minha profunda gratidão a todos os meus professores, que desde o primeiro dia de aula me mostraram a importância da Medicina Veterinária e me fizeram, cada dia mais, me apaixonar pela profissão. Em especial minha querida professora Dra. Ana Luiza Silva Guimarães, por me fazer acreditar no meu potencial e apoiar minha ideia sobre o texto de conclusão do curso desde o primeiro dia.

A minha querida professora Dra. Josemara da Silva Santos pelos ensinamentos e pelo exemplo de pessoa que é para mim, parceria para o resto da vida.

A todos os professores minha eterna gratidão, vou ser aluno de vocês para o resto da vida.

Agradeço também ao restaurante da faculdade, Meninas Gerais, por fazer essa comida deliciosa, que durante esses cinco anos e meio almocei mais com vocês do que em casa.

Quero agradecer ao Centro Universitário Luterano de Palmas pelo serviço de excelência prestado aos alunos e à comunidade, tornando verdade seu slogan “Conhecimento, quem tem vai além”.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente,  
Mas o que melhor se adapta às mudanças”

Charles Darwin

## RESUMO

TOLEDO, Itamar Rodrigues. **Produção *in vitro* de embriões de minivacas: relato de caso.** 2019. 54f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário Luterano de Palmas, Palmas/TO, 2019.

Com foco na produtividade o Brasil tem avançado nas pesquisas e aplicação de biotecnologias da reprodução. Entretanto, ainda há muito a ser explorado como é o caso da produção *in vitro* e transferência de embriões em raças miniaturas. Assim, o objetivo do presente trabalho é relatar a produção *in vitro* de embriões bovinos miniatura e transferência para vacas de porte convencional localizadas em Palmas - TO. Foram aspirados folículos de 9 doadoras miniatura cruzamento entre Jersey e Holandês obtendo aproximadamente 13 ovócitos viáveis por fêmea. Os ovócitos foram maturados, fecundados e cultivados no laboratório de produção *in vitro* de embriões, localizado na cidade de Anápolis-GO, onde a produção de embriões viáveis foi de 23,2 %. No dia 7 de desenvolvimento (D7) os embriões foram transferidos para 17 receptoras mestiças leiteiras e após 30 dias da inovulação por meio de exame de ultrassom verificou-se uma taxa de concepção de 76,4%. Desse modo, a técnica de produção *in vitro* e transferência de embriões é viável para a reprodução de mini vacas leiteiras, apesar da falta de dados em relação aos trabalhos realizados em animais de pequena estatura, que sirvam de parâmetros comparativos para os resultados alcançados no trabalho.

Palavras-chave: Reprodução. Mini vaca. Fertilização *in vitro*. Transferência de embrião.



## ABSTRACT

TOLEDO, Itamar Rodrigues. **In vitro production of miniature cattle embryos: case report**. 2019. 54f. Final Paper (Graduation) - Veterinary Medicine Course, Lutheran University Center of Palmas, Palmas / TO, 2019.

With a focus on productivity, Brazil has advanced research and application of reproductive biotechnologies. However, much remains to be explored, such as in vitro production and embryo transfer in miniature breeds. Thus, the objective of the present work is to report the in vitro production of miniature bovine embryos and transfer to conventional sized cows located in Palmas - TO. Nine follicles from 9 miniature Jersey-Dutch donors were aspirated to obtain approximately 13 viable oocytes per female. The oocytes were matured, fertilized and cultured at the in vitro embryo production laboratory, located in the city of Anápolis-GO, where the production of viable embryos was 23.2%. On day 7 of development (D7) the embryos were transferred to 17 crossbred dairy recipients and after 30 days of innovulation by ultrasound examination a conception rate of 76.4% was found. Thus, the technique of in vitro production and embryo transfer is viable for the reproduction of mini dairy cows, despite the lack of data regarding the work performed on small animals that serve as comparative parameters for the results achieved in the study.

Keywords: Reproduction. Miniature cattle. In vitro fertilization. Embryo transfer.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Dinâmica folicular, alterações ovarianas e hormonais durante o ciclo estral das fêmeas bovinas.....	24
Figura 2 - Protocolo de indução a sincronização e ovulação utilizados nas receptoras para transferência de embrião.....	35
Figura 3- Adaptações feita para melhor manejo dos animais.....	36
Figura 4- Aspiração folicular em mini vaca utilizando bomba a vácuo.....	37
Figura 5 – Separação dos ovócitos por doadora e colocação em meio de maturação para transporte ao laboratório de FIV.....	39
Figura 6 – bloqueio anestésico epidural com lidocaína 2% sem vasoconstritor em receptora.....	42
Figura 7- Técnica de congelamento lento para transferência direta.....	43
Figura 8 – Imagem ultrassonográfica de corno uterino gestante com 30 dias, evidenciando vesícula amniótica, contendo o embrião em seu interior.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos ovócitos encontrados nas mini vacas doadoras de acordo com sistema atribuído pela Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões.....	38
Tabela 2 – Classificação laboratorial da previsão de embriões por doadora para TE.....	40
Tabela 3 – Protocolo de transferência de embriões FIV.....	41
Tabela 4 – Avaliação de atividade gestacional em receptoras mestiças inovuladas com embriões de mini vacas leiteiras.....	45

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Imagens e classificação do complexo cumulus ovócitos.....	27
Quadro 2 - Imagens e classificação de embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> de acordo com o estágio de desenvolvimento.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGV's	Ácidos graxos voláteis
BE	Blastocisto eclodido
BI	Blastocisto inicial
BL	Blastocisto
BN	Blastocisto em eclosão
BX	Blastocisto expandido
CCO	Complexo cumulus-ovócito
CEULP	Centro Universitário Luterano de Palmas
CITOP	Citoplasmático
CIV	Cultivo in vitro
CL	Corpo lúteo
D	Dia
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
ECP	Cipionato de estradiol
EXP	Expandido
FIV	Fecundação in vitro
FSH	Hormônio folículo estimulante
G	Grau
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
GO	Góias
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IETS	International Embryo Transfer Society
IM	Intramuscular
IMCBSR	International Miniature Cattle Breeders Society and Registry
IV	Intravenoso
LH	Hormônio luteinizante
MIV	Maturação in vitro
PBS	Phosphate Buffured Saline
PIVE	Produção in vitro de embrião
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino

TE	Transferência de embrião
TO	Tocantins
UI	Unidades Internacionais
ULBRA	Universidade Luterana do Brasil

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
µg	Microgramas
µl	Microlitros
Cm	Centímetros
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
g	Gramas
Kg	Quilograma
Mg	Miligramas
MHz	Um milhão de Hertz
ml	Mililitros
mmHg	Milímetros de mercúrio
°C	Grau Celsius
P <sub>4</sub>	Progesterona

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>3. REFERÊNCIAL TEÓRICO</b> .....	20
3.1 RAÇAS MINIATURAS.....	20
3.2 ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTOR DA FÊMEA BOVINA .....	21
3.3 CICLO ESTRAL .....	22
3.4 DINÂMICA FOLICULAR .....	22
3.5 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	24
<b>3.5.1 Avaliação das doadoras e receptoras</b> .....	24
<b>3.5.2 Aspiração folicular</b> .....	25
<b>3.5.3 Maturação <i>in vitro</i></b> .....	28
<b>3.5.4 Escolha do sêmen</b> .....	29
<b>3.5.5 Fecundação <i>in vitro</i></b> .....	30
<b>3.5.6 Cultivo <i>in vitro</i></b> .....	30
<b>3.5.7 Classificação dos embriões</b> .....	30
<b>3.5.8 Transferência de embriões</b> .....	32
<b>3.5.9 Criopreservação de embriões</b> .....	33
<b>3.5.10 Diagnóstico de gestação</b> .....	33
<b>4. RELATO DE CASO</b> .....	34
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	46
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	48
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	49



## 1. INTRODUÇÃO

Os bovinos foram introduzidos no Brasil no período colonial e hoje é referência no comércio agropecuário mundial. Estes animais são ruminantes e foram domesticados há mais de 10000 anos, o que por si só, já provocou mudanças no seu comportamento reprodutivo (BATISTELLA *et al.*, 2011; BOLLONGINO *et al.*, 2012; EMBRAPA, 2017).

A agropecuária nacional está cada vez mais focada na produtividade, atualmente os avanços tecnológicos e evoluções científicas são a busca mais incessantes deste mercado. Assim, a reprodução animal vem sendo desenvolvida e aprimorada com o intento de melhorar a eficiência reprodutiva, aumentando a produção de animais geneticamente superiores em menor tempo (RENESTO & COELHO, 2004).

Várias biotécnicas foram desenvolvidas no decorrer dos anos, como a produção *in vitro* de embriões (PIVE), sendo progressivamente incorporada nos programas de melhoramento genético animal. Uma das formas de multiplicar um alto padrão genético dentro de um plantel é por meio da aspiração folicular, onde os ovócitos serão submetidos a fecundação *in vitro*, e posteriormente transferidos para fêmeas receptoras (GONÇALVES *et al.*, 2007; NEVES *et al.*, 2010).

Nesse contexto tecnológico, pouco se sabe sobre o emprego de biotécnicas em mini bovinos. Não é sabido o quantitativo desses animais em território nacional, mas no cenário mundial há uma crescente valorização desses animais pela sua estatura e produtividade, podendo produzir cerca de 8 a 10 litros de leite diariamente (FLORA, 2003; CERVENÁ, 2004).

Além disso, são muito utilizados como atração em exposição, zoológicos e feiras. É uma opção rentável ao produtor devido ao menor custo de criação e possui produtividade similar a uma vaca tradicional, são animais precoces e quando bem manejados iniciam sua vida produtiva aos 14 meses, geralmente com uma cria anual e apresenta estro 50 dias após o parto. No Brasil houve uma expansão da produção leiteira na última década, com um crescimento de 62,5%

(4,1% ao ano) entre 2012 e 2014. A produção de leite está presente em todos os estados, porém, os que mais produzem são Minas Gerais (26,6%), Rio Grande do Sul (13,3%), Paraná (12,9%) e Goiás (10,5%), sendo responsáveis por 63,3% da produção nacional (IBGE, 2017).

O objetivo deste trabalho é relatar a produção *in vitro* de embriões de mini vacas leiteiras e transferência para vacas receptoras de porte convencional das raças Girolando e Jersey, avaliando a produtividade de raças miniaturas e a eficiência das técnicas na reprodução desses animais.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é relatar o processo de produção *in vitro* de embriões de mini vacas leiteiras e a transferência para receptoras de porte convencional em uma propriedade em Palmas - Tocantins no ano de 2019.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fazer uma revisão literária sobre o tema, abordando aspectos relacionado a produção *in vitro* de embriões;
- Observar a efetividade dessa biotécnica neste tipo de rebanho;
- Comparar os resultados alcançados aos índices de estudos realizados em animais de estatura tradicional.

### 3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

#### 3.1 RAÇAS MINIATURAS

A domesticação foi um processo que esteve ligada ao tamanho dos animais. Historicamente, os animais eram menores devido as necessidades do homem por facilidade de manuseio e alojamentos, mas principalmente devido à escassez de alimentos (CERVENÁ, 2004).

Em meados do século XIX, as raças menores eram muito conhecidas e premiadas por sua estatura, aptidão leiteira e de carne, além de uso para aragem no cultivo de vegetais. No pós segunda Guerra, a mentalidade comercial mudou e o lema passou a ser “maior é melhor”, ideia apoiada pelos produtores da época, mudança essa que trouxe suas vantagens, como um maior volume de produção (ENNIS, 2003).

Na década de 70, surgiram muitas pesquisas que visaram criar um gado menor, porém produtivo e em uma pequena área de criação. Assim, na Austrália foi desenvolvido uma pesquisa para avaliar a eficácia do gado miniatura e os resultados obtidos apresentaram uma diferença de 5% entre as raças de porte convencional e as raças pequenas, despertando o interesse de alguns produtores (BODEN, 2008).

Com a migração populacional para os centros urbanos ou proximidades, mas com o desejo de manter uma vida mais bucólica, são criadas mais de 18 raças miniaturas na América do Norte. A Sociedade Internacional e Registro de Criadores de Gado Miniatura (*International Miniature Cattle Breeders Society and Registry* - IMCBSR) mantém registros das raças e seus padrões (GRANDWOL, 2007).

A IMCBSR subdivide essas raças de bovinos em três categorias: miniatura, miniatura tamanho médio e micro-mini-gado, mas sem esclarecimento da origem da nomenclatura. O tamanho e peso variam de acordo a raça, mas o peso médio é de aproximadamente 274 quilogramas (Kg) e a estatura é de 106 centímetro (cm) para miniaturas tamanho médio e aproximadamente 92 cm para o micro-mini-gado (ROHTER, 1987; GRANDWOL, 2007).

Em território internacional, cada raça desenvolvida tem sua própria associação de criadores e diretrizes específicas. Mas, apesar de serem menores, estes animais são proporcionais e nem todos apresentam genes de nanismo. Em outros países, como os Estados Unidos estes animais são testados geneticamente antes de serem registrados e, aqueles que apresentam genes de nanismo não são registrados e devem ser retirados da reprodução. No Brasil, não há dados ou estimativas sobre o rebanho de gado miniatura pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística ou pela Associação Brasileira de Criadores de mini gado (IBGE, 2018).

### 3.2 ANATOMIA DO SISTEMA REPRODUTOR DA FÊMEA BOVINA

As estruturas que compõem o sistema reprodutivo de uma fêmea bovina são: vulva, vagina, útero, tubas uterinas e ovários. Estes órgãos são responsáveis por produção de ovócitos, capacitação espermática, fecundação, manutenção da gestação e parto (KÖNIG & LIEBICH, 2011).

A vulva é uma proteção da entrada da vagina, que é o órgão copulador da fêmea. As tubas uterinas se dividem em lado direito e esquerdo e é subdividida em istmo, ampola e infundíbulo. Sua função é capacitar o espermatozoide no istmo e captar o ovócito pelo infundíbulo para que na ampola ocorra a fecundação. Cranial as tubas e caudal aos rins, estão os ovários. Eles são capazes de produzir hormônios como progesterona (P4) para manutenção da prenhez e estrógeno para a produção de ovócitos (DUKES, 2014).

As carúnculas são localizadas no tecido subepitelial e são vascularizadas. Seus vasos sanguíneos tendem a seguir em direção a superfície, crescem rapidamente e desenvolvem criptas para aumentar a área de superfície de contato que atua através da conexão com o córion. Mantendo assim, a aposição fixa completa da placenta e o endométrio, onde há as principais trocas de gases e pequenas moléculas durante a gestação (ATKINSON *et al.*, 1984; KÖNIG & LIEBICH, 2011.).

### 3.3 CICLO ESTRAL

O ciclo estral é caracterizado como o intervalo entre dois estros, nos ruminantes esse tempo decorrido é de aproximadamente 21 dias. As fêmeas ciclam o ano inteiro sendo caracterizadas como poliéstricas anuais. A regulação do ciclo é hormonal e inicia-se com a liberação de Hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo estimulando a hipófise a sintetizar hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), que agirão diretamente nos ovários no recrutamento, seleção e maturação de ovócitos (REECE, 2019).

O ciclo apresenta duas fases distintas denominadas fase folicular e fase luteínica e subdivididas em metaestro, diestro, proestro e estro. Na fase folicular há o desenvolvimento dos folículos e compreende as fases de proestro e estro. No proestro, a fêmea apresenta alterações comportamentais como a realização de monta em outras fêmeas e a recusa de montas em si mesmas (DUKES, 2014).

Quando o estro se finda tem início a fase luteínica, dividida em metaestro e diestro. Nessa etapa há a formação do corpo lúteo e produção de progesterona, principalmente no diestro devido a formação completa do corpo lúteo (CL). Nessa fase o animal não permite a monta, mas é no metaestro que ocorre a ovulação das fêmeas bovinas enquanto que o período de diestro é uma fase de inatividade sexual que dura por volta de 24 dias (CAETANO & CAETANO JR., 2015).

O estro é chamado vulgarmente de cio, podendo durar até 30 horas dependendo das condições ambientais a que o animal é submetido. Os sinais manifestados pelo animal são inquietação, edemaciação de vulva, muco vaginal, micção frequente e aceitação de monta (DUKES, 2014).

### 3.4 DINÂMICA FOLICULAR

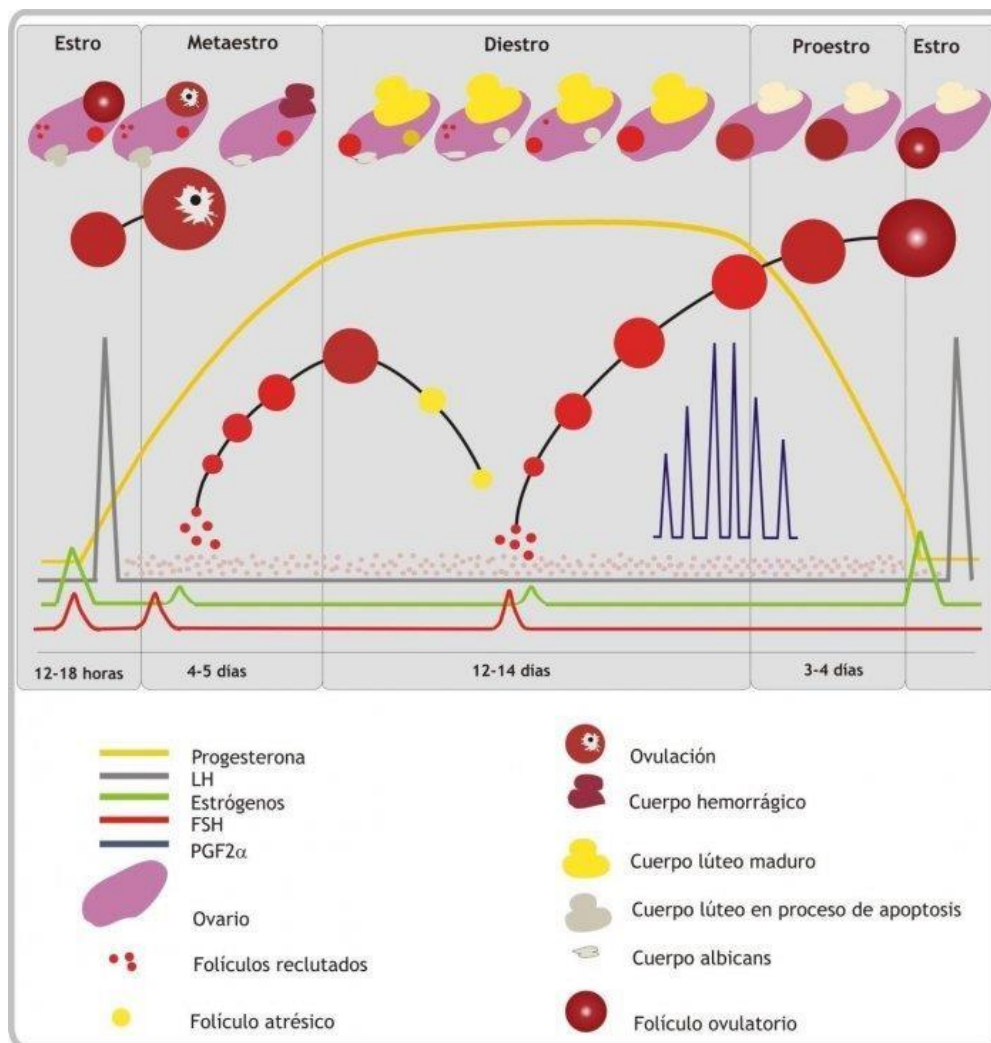
No ciclo estral, o crescimento folicular e regressão é uma atividade contínua, entretanto a maioria dos folículos não é capaz de progredir, entrando em atresia (AERTS & BOLS, 2010). Essa progressão do folículo, ocorre com as denominadas ondas foliculares, que duram entre 6 a 15 dias. São caracterizadas

pelo crescimento de folículos antrais, seleção do folículo dominante e atresia dos demais folículos, como já citado, sob ação da progesterona (HENRIQUE, 2007).

Durante o ciclo estral, estima-se que haja de 2-3 ondas foliculares que variam de acordo com a duração do ciclo e da fase luteal sendo divididas em fase de recrutamento, seleção e dominância. O recrutamento dos folículos iniciase com o aumento da concentração de FSH circulante estimulando o crescimento do folículo e, conseqüentemente há um aumento da síntese de estradiol (MELLO, 2014).

A fase de seleção ocorre quando um folículo atinge determinado tamanho, então ocorre um mecanismo de bloqueio do segundo maior folículo. O maior folículo é o dominante, ele continua seu desenvolvimento mesmo em níveis basais de FSH ao ter sua síntese diminuída pela ação do estradiol e inibina - A liberados pelos folículos. O folículo dominante então passa a depender da produção de LH até ser maturado (HENRIQUE, 2007), como apresentado na figura 1.

Figura 1- Imagem ilustrativa da dinâmica folicular, alterações ovarianas e hormonais durante o ciclo estral das fêmeas bovinas.



Fonte: Gonzalez (2018).

### 3.5 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

#### 3.5.1 Avaliação das doadoras e receptoras

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) permite o aumento da produção de bezerros por fêmea, contribuindo significativamente com o processo de melhoramento genético do rebanho nacional por unidade de tempo. Entretanto,



um bom resultado nessa biotecnologia está condicionado a eficiência reprodutiva das doadoras e receptoras (MOORE & HASLER, 2017).

Entre os pilares da produção animal que afetam a reprodução, está a nutrição que interfere nas concentrações plasmáticas dos hormônios circulantes, na quantidade de corpos lúteos e folículos e ainda na qualidade dos ovócitos e embriões (SARTORI *et al.*, 2010).

Para determinar a fase do ciclo estral e/ou o diagnóstico de doenças no sistema reprodutor da fêmea e assim avaliar a aptidão reprodutiva desse animal, o exame ultrassonográfico é indispensável. Devido ao fluido folicular absorver grande parte das ondas ultrassonográficas, os folículos apresentam-se hipocogênico e são facilmente visualizadas no monitor (DESCÔTEAUX *et al.*, 2010).

Nas doadoras, além da avaliação do folículo, o ultrassom permite observar a dominância folicular e assim, agendar a aspiração ou, de acordo a necessidade, início de um protocolo hormonal. Para receptoras devem ser selecionadas fêmeas com um escore corporal bom, com ciclicidade regular e que não apresente alterações sanitárias (DESCÔTEAUX *et al.*, 2010).

Para avaliação de alterações patológicas (doenças infectocontagiosas, deformidades e etc.) para passagem do inovulador deve ser realizado a palpação transretal. A avaliação ultrassonográfica é um coadjuvante, permitindo uma rápida seleção das fêmeas aptas a receber o embrião (DESCÔTEAUX *et al.*, 2010).

Algumas patologias podem ser observadas nessa avaliação, como o cisto folicular, o cisto ovariano, mucometra e hidrometra entre as mais comuns. Diagnósticos precoces e intervenções rápidas melhoram o sistema reprodutivo da propriedade (MOORE & HASLER, 2017).

### **3.5.2 Aspiração folicular**

Na aspiração folicular, não há necessidade de recuperar os ovócitos com uso de hormônios quando esta é guiada por ultrassom. A vulva deve ser higienizada com água, sabão e seca com papel toalha. Para evitar-se os

movimentos peristálticos e possíveis traumas durante a manipulação faz-se bloqueio epidural na articulação sacrococcígea com lidocaína a 2% (FILHO MESQUITA, 2015).


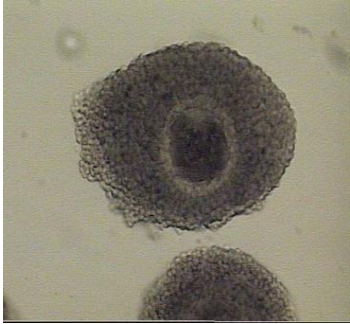
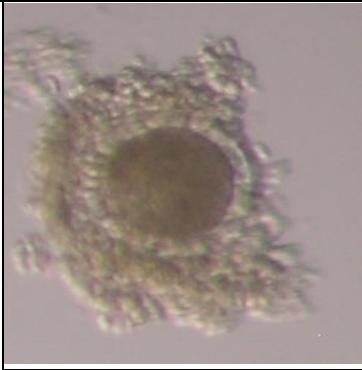
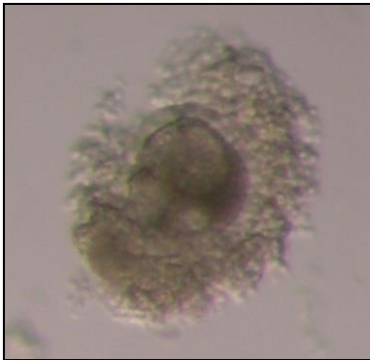
Para aspiração, utiliza-se bomba a vácuo em uma pressão de 72 a 78 mmHg conectado a uma agulha 18G e vazão de 15 ml de meio por minutos. Para a visualização dos folículos, utiliza-se ultrassom com transdutor micro convexo de 5 ou 7,5 MHz conectado a uma guia de biópsia inserida até o fundo vaginal para então serem aspirados e posicionados no percurso da linha de punção (LEIVAS, 2006).

O conteúdo aspirado é recebido em meio proteico que favorece a maturação ovocitária e o desenvolvimento embrionário, e então filtrado e lavado com a mesma solução utilizada para aspiração, em uma temperatura de aproximadamente 36°C. Este meio é constituído por PBS, heparina e alguns profissionais optam por uso de soro fetal bovino (SFB) (ANTONIOLI, 2005).

Com o uso de uma lupa, observa-se o sedimento que permaneceu no filtro. No interior do folículo há um ovócito envolto por células da granulosa, denominado complexo cumulus ovócitos (CCO), sua função é ativar o crescimento e a maturação do ovócito, atividade regulada por substâncias produzidas pelo próprio ovócito (FILHO MESQUITA, 2015).

Na procura dos ovócitos, o ambiente precisa estar limpo, os equipamentos estéreis e fazer uso de pano de campo esterilizado sobre a bancada. Assim, após todo o cuidado higiênico, são procurados e selecionados os ovócitos de grau I, II e III (GONÇALVES, 2007) demonstrado no quadro 1 abaixo:

Quadro 1- Imagens e classificação do complexo cumulus ovócitos.

CÉLULAS	CLASSIFICAÇÃO
	<p>Grau I: Complexo cumulus ovócito com citoplasma homogêneo e com granulações finas e múltiplas camadas compactas de células do cumulus</p>
	<p>Grau II: Ovócito com citoplasma homogêneo com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares, cumulus compacto menor do que na categoria 1 com pelo menos 5 camadas completas</p>
	<p>Grau III: Ovócito com citoplasma heterogêneo/vacuolizado, a zona pelúcida coberta com pelo menos 3 camadas de células do cumulus e/ou com pequenas áreas desnudas</p>
	<p>Grau IV: Citoplasma heterogeneamente pigmentado e o cumulus completamente/parcialmente ausente ou expandido</p>

Fonte: LEIBFRIED & FIRST, 1979.

### 3.5.3 Maturação *in vitro*

Na maioria das espécies mamíferas, os folículos primordiais contêm ovócitos pequenos e imaturos. Em intervalos regulares, há um crescimento e maturação dessas células no ovário, mas apenas um poderá ser ovulado e os outros entrarão em atresia. Assim, a técnica de maturação *in vitro* (MIV) é realizada para que os ovócitos alcancem a metáfase II e tenham capacidade de serem fecundado (CHAVES *et al.*, 2010).

A maturação é um processo complexo com vários eventos nucleares e modificações estruturais até que se alcance a metáfase II. Dentro do folículo, os ovócitos estão em estágio de diplóteno da prófase meiótica, as células do *cumulus* circundam o ovócito e projetam-se até a zona pelúcida alcançando o oolema e as junções *Gap*. Ocorre então uma onda pré-ovulatória de LH e durante essa liberação hormonal há a quebras das junções rompendo o *cumulus* e fazendo com que haja a maturação do ovócito (ARAÚJO, 2014).

Toda essa organização folicular até a ovulação é coordenada pelo próprio ovócito, sendo considerado o regente da proliferação das células da granulosa, da proliferação dessas células e das células da teca e do aumento da resposta células as gonadotrofinas (GUEMRA *et al.*, 2013).

O ovócito apresenta maturação nuclear e citoplasmática com potencial dependente de características macroscópicas do folículo. A fase de maturação nuclear e caracterizada pelo estágio ovocitário em metáfase II. Enquanto que a maturação citoplasmática é definida por todos os processos de torná-lo fecundante e capaz de desenvolvimento embrionário (KURTZ FILHO *et al.*, 2002).

No sistema *in vitro*, para a maturação ovocitária, várias formas de cultivo têm sido desenvolvidas. O estágio inicial do folículo é inerente ao número de folículos disponíveis, à capacidade e a taxa de desenvolvimento. Por isso, o cultivo de folículos primordiais tem uma produção mais abundante, porém mais lenta. Mesmo assim, há um aumento drástico do potencial reprodutivo de mamíferos (CHAVES *et al.*, 2010).

Os meios de maturação mais comuns são meio de cultivo tecidual 199, TCM 199; DMEM, Ham's F-10, Ham's F-12 entre outros. Esses meios fornecem suplementos que, apesar de pouco esclarecidos, aumentam significativamente os números de blastocistos (KURTZ FILHO *et al.*, 2002; ARAÚJO, 2014).

Para a maturação, podem ser adicionados coadjuvantes a esses meios, como o fluido folicular ou um co-cultivo com células da granulosa. Nesse processo, os ovócitos também estão sujeitos a condições fisiológicas que influenciam seu desenvolvimento como a oxidação, mudanças de pH, alterações de temperatura, composição iônica e osmolaridade (KURTZ FILHO *et al.*, 2002; ARAÚJO, 2014).

A visualização de estágio de metáfase II do ovócito é feito com microscopia óptica. Para tal, os ovócitos são fixados com metanol-ácido acético e corados com lacmióide a 1% em solução de ácido acético à 45% ou com arceína a 1% em solução de ácido acético à 40%, e ainda com Azul Cresil Brilhante. A observação do estágio pode ser feita também por fluorescência, nessa técnica, após a maturação, os ovócitos são desnudados e marcados com Hoechst 33342 e então visibilizados em microscópio invertido com fluorescência (GUIMARÃES, 2013).

Durante a avaliação da maturação, é observado o grau de expansão e morfologia do *cumulus*, comumente. A maturação citoplasmática é determinada por microscopia eletrônica com a observação da organização das organelas, clivagem partenogênica e migração dos grânulos corticais, ou ainda pela técnica de fecundação (ARAÚJO, 2014).

#### **3.5.4 Escolha do sêmen**

O sêmen a ser utilizado deve ser escolhido pelo produtor de acordo com as características genéticas que deseja repassar ao rebanho. Na PIVE, o uso de sêmen sexado permite alcançar uma proporção macho e fêmea ideal e um ganho genético de 15% em relação ao convencional. Na PIVE, também é utilizado o

sêmen reverso, material genético daqueles animais que já foram a óbito ou não são mais produtores de sêmen (GOUVEIA, 2011).

### **3.5.5 Fecundação *in vitro***

O sucesso da fecundação *in vitro* depende da viabilidade e qualidade dos espermatozoides e dos ovócitos. Depois da escolha do sêmen, os espermatozoides viáveis podem ser separados por dois métodos, *Swin up* ou pelo gradiente de densidade do Percoll (GOUVEIA, 2011).

Para o meio Percoll é utilizado dois tubos com o meio nas concentrações 90 e 45% e uma dose de sêmen. O tubo é centrifugado a 5000 rpm por cinco minutos (sêmen sexado) ou a 10000 rpm por 20 minutos (sêmen convencional). Após a separação, deve ser fornecido um ambiente que permita a capacitação espermática e a fecundação do ovócito, o meio mais usado é o TALP-FIV com heparina (GOUVEIA, 2011).

### **3.5.6 Cultivo *in vitro***

Para o cultivo *in vitro*, após a fecundação, os zigotos são lavados e transferidos para um meio de cultivo construídos de óleo mineral e SOFaaci (fluido sintético do oviduto acrescido de aminoácidos) fluidos uterino baseados na fisiologia do início de gestação. Os zigotos permanecem no meio até atingirem o estágio de Blastocisto, apenas 25 a 35% dos embriões chegam a essa fase (CAVALCANTI *et al.*, 2018).

### **3.5.7 Classificação dos embriões**

A classificação dos embriões *in vivo* é normatizada pela Sociedade Internacional de Transferência de Embrião (IETS), e o estágio vai de 1 a 9 e é um potencial sinalizador da capacidade de desenvolvimento embrionário (CAVALCANTI *et al.*, 2018).

Os embriões são classificados em: Mórula (Mo), Blastômeros individuais não-distintos, espaço perivitelino ocupado pelo embrião. Mórula Compacta (Mc), Blastômeros individuais tornam-se mais próximos, formando uma massa embrionária compacta que ocupa dois terços do espaço perivitelino. Blastocisto

Inicial (Bi), Embrião com a cavidade preenchida com fluido ou blastocele, ocupando três quartos de espaço perivitelinico, trofoblasto e MCI podem ser diferenciadas (HAFEZ *et al.*, 2004).

Também são classificados em Blastocisto (BL), pronunciada diferenciação do trofoblasto externo, MCI compacta e mais escura, blastocisto muito proeminente e embrião ocupando quase todo o espaço perivitelinico. Blastocisto expandido (Bx), o embrião cresce notadamente em tamanho, a zona pelúcida torna-se mais fina. Blastocisto em Eclosão (Bn), o embrião no processo de eclosão, zona pelúcida desprendida. Blastocisto Eclodido (Be), o embrião reexpandido com blastocisto grande, circular, muito frágil e em estágios mais avançados, alongados (HAFEZ *et al.*, 2004).

Quadro 2 - Imagens e classificação de embriões bovinos produzidos *in vivo* de acordo com o estágio de desenvolvimento.

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

Fonte: Viana, 2013.

### 3.5.8 Transferência de embriões

Na transferência de embriões, realizado por técnica transcervical ou método cirúrgico, ocorre a inovulação, onde o embrião é depositado no corno uterino onde há a presença de corpo lúteo (LEIVAS, 2006).



As vacas receptoras precisam estar sincronizadas com os embriões, para isso é feito um protocolo nestas fêmeas semelhantes aos protocolos de Inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Assim, no dia 0 é implantado P4 e benzoato de estradiol. No oitavo dia há a retirada do implante e aplicação de luteolítico, no dia seguinte aplica-se novamente o estradiol para no 16<sup>o</sup>/17<sup>o</sup> dia possa ser feito a transferência (GOUVEIA, 2011).

### **3.5.9 Criopreservação de embriões**

Os métodos mais utilizados para a criopreservação de embriões é o congelamento clássico (lento) e a vitrificação. As vantagens do congelamento lento é o uso de baixa concentração de criopreservadores, porém causa lesões as organelas e a membrana celular devido a formação de cristais de gelo (SERAPIÃO *et al.*, 2005).

Na técnica de vitrificação usa-se altas concentrações de criopreservadores que formam uma solução viscosa que durante o resfriamento faz a solidificação sem a formação de cristais de gelo. Comparações entre os dois métodos são feitas voltadas a morfologia da célula criopreservada. Foi demonstrado em pesquisa que a criopreservação causa alteração molecular influenciando na expressão de alguns genes (DALCIN & LUCCHI, 2010).

### **3.5.10 Diagnóstico de gestação**

O diagnóstico de prenhez é altamente eficaz com uso de ultrassonografia, pois permite um diagnóstico precoce para ser instituído novo protocolo nas fêmeas não gestantes. Entretanto essa acurácia está condicionada a fatores intrínsecos e extrínsecos ao animal como a idade e raça, por exemplo, e experiência do avaliador (ARAÚJO, 2014).

As perdas embrionárias, são um dos fatores associados a infertilidade em vacas. O período crítico para os embriões é entre os primeiros 45 dias, mas a maior parte das perdas ocorrem no fim do primeiro mês de gestação. A alterações ocorridas nas perdas fetais são sutis e de difícil percepção através de palpação transretal (GOUVEIA, 2011).

#### 4. RELATO DE CASO

A técnica de PIVE foi realizada no laboratório de produção *in vitro* de embriões (Embriotec) localizado na cidade de Anápolis- GO, durante o período de Outubro a Novembro de 2019. Os animais utilizados como doadoras e receptoras no presente trabalho, eram oriundos da chácara Nossa Senhora de Aparecida localizada no município de Palmas- TO que foram conduzidos para o Hospital Veterinário do CEULP/ULBRA, onde procedeu a aspiração, rastreamento e seleção dos ovócitos.

Foram utilizadas 9 mini vacas com boa aptidão leiteira (8 litros de leite/dia) criadas em sistema semi-intensivo, de alto valor genético, livres de doenças infecciosas e reprodutivas, com idade variando entre 3 e 10 anos, estando todas em lactação. Estes animais, eram criados sob o regime de confinamento, sendo sua dieta composta de silagem de milho, ração concentrada e fornecimento de água e sal mineral *ad libitum*.

Foram selecionadas 20 vacas como receptoras dos embriões produzidos, sendo 15 vacas da raça Girolando e 5 vacas da raça Jersey. Esses animais passaram por avaliação clínica e ginecológica onde não foi evidenciado nenhuma alteração, com idade entre 2 e 8 anos, com bom escore corporal, todas estando em lactação.

O doador de sêmen, foi um mini boi com 7 anos de idade, de alto valor genético, possuindo filhas com aptidão leiteira, proveniente da Fazenda Barcelona no município de Bom Despacho no Estado de Minas Gerais. Para a FIV, foi utilizado o sêmen congelado deste animal.

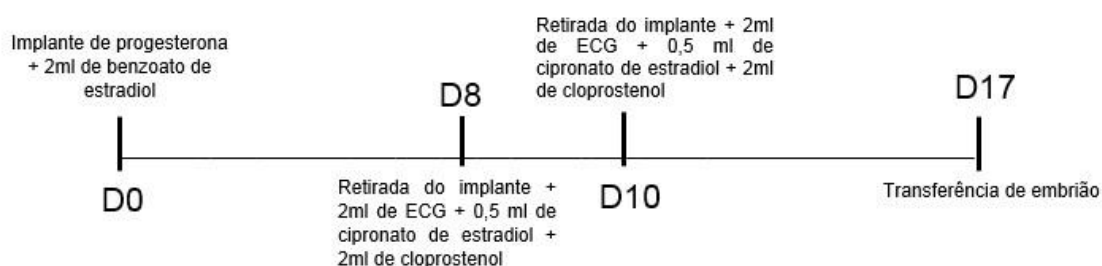
##### 4.1 PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO EM RECEPTORAS

As fêmeas destinadas para serem receptoras, receberam protocolos hormonais com a finalidade de sincronização de cio, no dia 05 de outubro de 2019, data definida como D0, as vacas receberam um implante intravaginal

composto de 1,0g de progesterona (Sincrogest®) e 2,0mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol®) por via intramuscular (IM).

Após oito dias (D8), o implante intravaginal foi retirado e os animais receberam 2 ml de cloprostenol sódica (Sincrocio®), 2 ml de gonadotrofina coriônica equina (Sincro eCG®) e 0,5ml de Cipionato de estradiol (E.C.P.®) por via IM. No D10 foi detectado cio nas as receptoras e no D17 foram inovuladas, como esquematizado na figura 2.

Figura 2 - Protocolo de indução a sincronização e ovulação utilizados nas receptoras para transferência de embrião.



Fonte: Arquivo pessoal (2019).

#### 4.2 ASPIRAÇÃO FOLICULAR DAS DOADORAS

No dia 15 de outubro de 2019, 09 doadoras foram conduzidas ao setor de reprodução animal do Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA), para realizar a aspiração.

Devido à baixa estatura dos animais, e ainda não possuir no mercado troncos de contenção específicos para o manejo das mini vacas, foram realizados adaptações na estrutura para possibilitar que facilitasse o acesso do médico veterinário ao aparelho reprodutor das mesmas (FIGURA 3), foram postas tábuas, de modo que se elevasse a altura dos animais no interior do tronco.

Figura 3- Adaptações feita para melhor manejo dos animais.



Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Para a realização da aspiração folicular, foi preparado uma mesa com aparelho de ultrassonografia equipado com a bomba de vácuo e a sonda de aspiração, tubos com meios de transporte, e os EPI'S necessários para a realização de forma eficaz do procedimento.

Com os animais posicionados no tronco, realizou-se bloqueio epidural utilizando anestésico local lidocaína a 2% sem vasoconstritor (2-3 ml por animal) e antissepsia da região perianal dos animais. O veterinário realizou palpação retal e fez a avaliação ginecológica das doadoras e, posteriormente, introduziu a guia de aspiração folicular na vagina que é acoplada a uma bomba de vácuo com função de aspirar todo o conteúdo folicular no momento em que a agulha de aspiração é direcionada ao folículo que está sendo visualizado no ultrassom (FIGURA 4).

Figura 4- Aspiração folicular em mini vaca utilizando bomba a vácuo.



Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Após cada aspiração o conteúdo obtido foi acondicionado em tubo em temperatura adequada, identificado e levado imediatamente ao laboratório para ser rastreado, qualificado e quantificado.

Os ovócitos das doadoras foram categorizados de acordo com a classificação da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE) em graus de I a IV conforme a tabela 1, que teve um total de 116 ovócitos coletados, sendo 4 ovócitos de grau I, 14 ovócitos de grau II, 14 ovócitos sem células do cumulus, 5 ovócitos expandidos e 79 ovócitos citoplasmáticos.

**Tabela 1 – Classificação dos ovócitos encontrados nas mini vacas doadoras de acordo com sistema atribuído pela Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões.**

ANIMAL	RAÇA	DEGENERADOS					TOTAL
		GI	GII	S/CUM	EXP	CITOP	
D 1	MINI VACA	1	1	1	0	6	9
D 2	MINI VACA	3	1	2	0	23	29
D 3	MINI VACA	0	0	1	0	7	8
D 4	MINI VACA	0	0	1	0	14	15
D 5	MINI VACA	0	0	1	1	5	7
D 6	MINI VACA	0	0	0	1	0	1
D 7	MINI VACA	0	2	1	0	7	10
D 8	MINI VACA	0	10	7	3	10	30
D 9	MINI VACA	0	0	0	0	7	7
NÚMERO TOTAL DE OVÓCITOS COLETADOS ->							116

Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Os ovócitos selecionados foram separados por doadoras e colocados em meio de maturação para transporte, sendo acondicionado em caixas transportadoras de embrião em temperatura de 37,6°C e direcionados ao laboratório de produção in vitro de embriões, localizado na cidade de AnápolisGO (FIGURA 5).

Figura 5 – Separação dos ovócitos por doadora e colocação em meio de maturação para transporte ao laboratório de FIV.



Fonte: Arquivo pessoal (2019).

### 4.3 FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

Os 116 ovócitos coletados foram enviados para o laboratório no dia 15 de outubro de 2019. A fertilização *in vitro* foi realizado no laboratório Embriotec, localizado na cidade de Anápolis no estado de Goiás. Para a fertilização, foi utilizado uma dose de sêmen convencional congelado em paleta contendo 0,5 ml com  $25 \times 10^6$ , provenientes do touro coletado

### 4.4 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

Após realizada a fertilização e cultivo *in vitro*, dos 116 ovócitos enviados ao laboratório de FIV, 32 estruturas foram formadas, com previsão de 17 a 22

embriões. Porém, até o final da transferência houve 27 embriões, conforme a tabela a seguir:

**Tabela 2 – Classificação laboratorial da previsão de embriões por doadora para TE.**

TUBO	ESTRUTURAS	PREVISÃO	DOADORA
1	2	1 a 2	D 1
2	13	7 a 8	D 2
3	5	2 a 3	D 4
4	3	3	D 5
5	6	4 a 5	D 8
6	3	0 a 1	D 9

Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Os embriões chegaram em tubos, com temperatura de 37,6°C, em meio de cultura de transporte, devidamente identificados com o nome da doadora. Foi colocado em placa de Petri e selecionado os embriões, classificados e envasados.

Foi montado uma mesa de apoio, próxima ao tronco de contenção de animais, onde foi realizado a palpação retal das receptoras, identificando a presença de corpo lúteo nestas fêmeas. Das 20 receptoras que receberam protocolo hormonal para sincronização do cio anteriormente, apenas 17 apresentavam corpo lúteo funcional.

Foi realizado no dia 24 de outubro de 2019 a transferência de embriões nas 17 receptoras aptas, conforme a tabela 3 a seguir:



Tabela 3 – Protocolo de transferência de embriões FIV.

<i><b>DOADORA</b></i>	<i><b>NºEMBRIÃO</b></i>	<i><b>ESTÁGIO</b></i>	<i><b>GRAU</b></i>	<i><b>RECEPTORA</b></i>
<i>D 9</i>	<b>1</b>	BX	G I	R 1
<i>D 8</i>	<b>6</b>	BX	G I	R 2
				R 3
				R 4
				R 5
				R 6
				R 7
<i>D 5</i>	<b>2</b>	BX	G I	R 8
<i>D 2</i>				R 9
	<b>3</b>	BX	G I	R 10
				R 11
				R 12
<i>D 4</i>	<b>9</b>	BX	G I	9 NÃO IMPLANTADO
	<b>3</b>	BL	G I	R 13
				R 14
<i>D 1</i>				R 15
	<b>1</b>	BL	G I	1 NÃO IMPLANTADO
	<b>2</b>	BX	G I	R 16
				R 17

Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Para a realização da transferência de embriões, aplicou-se anestesia epidural com Lidocaína a 2% (5 ml por animal) sem vasoconstritor. Foi montado o aplicador com a paleta contendo o embrião e efetivada a deposição do embrião no corno ipsilateral ao corpo lúteo previamente identificado (FIGURA 5).

Figura 6 – bloqueio anestésico epidural com lidocaína 2% sem vasoconstritor em receptora.



Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Após a transferência, foi recomendado pelo o médico veterinário que os animais não recebessem qualquer tipo de aplicação de antiparasitários, e que fosse mantido alimentação e suplementação de qualidade e manejo mínimo com a finalidade de evitar estresse das receptoras. Dos 27 embriões, 10 foram congelados em método clássico para descongelamento direto (FIGURA 6)

#### 4.5 DIAGNÓSTICO DE PRENHEZ

Trinta dias após de realização da fecundação in vitro e decorrido 22 dias da transferência dos embriões, com a utilização de aparelho ultrassonográfico para diagnóstico gestacional. Avaliou-se a presença de liquido e vesícula embrionária no corno uterino das 17 receptoras que receberam os embriões provenientes da FIV (FIGURA 7).

Figura 7- Técnica de congelamento lento para transferência direta.



Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Figura 8 – Imagem ultrassonográfica de corno uterino gestante com 30 dias, evidenciando vesícula amniótica, contendo o embrião em seu interior.



Fonte: Arquivo pessoal (2019).

Dentre as 17 receptoras avaliadas mediante exame ultrassonográfico, foram obtidos os seguintes resultados conforme a tabela a seguir, em que 13 foram diagnosticadas como prenhes.

**Tabela 4 – Avaliação de atividade gestacional em receptoras mestiças inovuladas com embriões de mini vacas leiteiras.**

<b>RECEPTORA</b>	<b>DIAGNÓSTICO GESTACIONAL</b>
<i>R 1</i>	Vazia
<i>R 2</i>	Prenhe
<i>R 3</i>	Prenhe
<i>R 4</i>	Prenhe
<i>R 5</i>	Prenhe
<i>R 6</i>	Prenhe
<i>R 7</i>	Prenhe
<i>R 8</i>	Prenhe
<i>R 9</i>	Vazia
<i>R 10</i>	Prenhe
<i>R 11</i>	Prenhe
<i>R 12</i>	Prenhe
<i>R 13</i>	Prenhe
<i>R 14</i>	Prenhe
<i>R 15</i>	Vazia
<i>R 16</i>	Prenhe
<i>R 17</i>	Vazia

Fonte: Arquivo pessoal (2019).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A punção folicular guiada por ultrassom é um método pouco invasivo que proporciona ovócitos de qualidade (SENEDA *et al.*, 2003). Na aspiração folicular OPU foram obtidos um total de 116 ovócitos, uma média de aproximadamente 13 por fêmea, valor semelhante ao encontrado por Renesto e Coelho (2004) ao aspirar fêmeas Nelore em procedimento similar.

Todos os ovócitos aspirados foram enviados ao laboratorial e foram obtidos 27 embriões, um aproveitamento de 23,2 % dos folículos aspirados. A utilização de ovócitos imaturos pode interferir na eficiência da produção *in vitro* (BECHER, 2018). Os ovócitos classificados como viáveis foram enviados para PIVE em meio de maturação e transportados a uma temperatura de 37,5°C, como realizado por Gonçalves *et al.*, (2017)

Apenas 85% das receptoras estavam aptas a receber os embriões, e as inovuladas apresentaram uma taxa de prenhes de 76,4%, valor muito superior ao observado por Scanavez (2013) em raças mestiças que foi de 35,5%, e maior do que o encontrado por Mello (2015). A alta taxa de aproveitamento de receptoras, pode ser decorrente de manejo nutricional adequado. Deficiências nutricionais, principalmente de minerais, há diminuição da fertilidade, deficiência perdas gestacionais ou nascimentos de bezerros fracos (SOUZA, 2014).

Spell *et al.*, (2001) obteve resultados similares ao descrever que a influenciada da sincronia embrião-receptora taxa de prenhez. Na PIVE, é um dos parâmetros mais importantes na seleção das receptoras. O que não foi observado nos resultados deste trabalho.

Os programas de transferência de embriões se iniciam com a identificação de receptoras, que estejam ciclando, sendo um forte indicador de que responderá satisfatoriamente a técnica de sincronização de ciclo estral com as doadoras (GOUVEIA, 2011).

Em trabalho feito com mestiças leiteiras, onde foram realizadas 1110 transferências, não foi observado efeito significativo do grau de desenvolvimento do embrião sobre as taxas de prenhez e perdas gestacionais (SCANAVEZ *et al.*,

2013)

A raça pode ser um fator limitante para o sucesso da produção de embriões *in vitro*, sendo correto a aplicação em raças com alto potencial de recuperação ovocitária. Havendo a necessidade de aplicação da técnica em raças de maior potencial de recuperação de ovócitos e produção embrionária. Os dados também sugerem a necessidade de avaliação individual da fêmea para o sucesso da PIVE (CARVALHO *et al.*, 2012).

As raças mestiças Gir e Holandês apresentam potencial como doadoras de ovócitos e eficiência no sistema de produção *in vitro* de embriões similar às vacas zebuínas, independentemente da raça do touro doador do sêmen utilizado. Vacas F1 podem ser utilizadas como doadoras de ovócito para PIVE, considerando-se apenas a eficiência de produção de embriões *in vitro* (ROSA, 2011).

Em locais de clima tropical, o uso de ovócitos de vacas Gir leiteiras é mais eficiente no sistema de PIVE. Atualmente, ainda é possível observar publicações sobre aspectos a serem melhorados para elevação das taxas de produtos obtidos *in vitro* como as influências de hormônios no desenvolvimento da competência ovocitária, compreensão de técnicas de vitrificação e punção folicular (SENEDA & BLASCHI, 2012), tempo entre aspiração do folículo e início dos processos realizados *in vitro* e estresse térmico sobre os animais (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Na última década o Brasil passou por um crescimento significativo no segmento das biotecnologias. Após um amplo e consolidado conhecimento sobre a obtenção de embriões *in vivo*, o país passou a dominar a aspiração folicular e a PIVE, com uma posição importante no mercado de embriões bovinos, sobretudo, por possuir o maior rebanho comercial do mundo (BATISTELLA *et al.*, 2011; IBGE, 2018).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção *in vitro* é uma técnica viável, mesmo em pequenas propriedades e permite um maior aproveitamento da capacidade genética de cada animal. As mini-vacas são animais muito produtivos, porém não se encontra na literatura parâmetros que possam ser usados como referência para a produção *in vitro* e transferência de embriões nessas raças. Entretanto, as raças miniaturas apresentaram resultados semelhantes aos de fêmeas bovinas de porte convencional equiparando a capacidade reprodutiva de ambas. Demonstrando assim, uma boa produtividade das fêmeas miniaturas no uso de biotécnicas reprodutivas.



## 7. REFERÊNCIAS

- AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. **Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species.** Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reproduction in Domestic Animals*, v.45, p.180-187, 2010.
- ANTONIOLLI, C. B. Produção in vitro de embriões utilizando diferentes condições de maturação oocitária. Tese (mestrado). Arquivo da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/4329>>. Acesso em: 12 dez 2019.
- ARAÚJO, M. S. et al. Principais mecanismos envolvidos na maturação oocitária em bovinos: da oogênese à maturação in vitro. *Enciclopédia Biosfera, centro científico Conhecer*, v. 10, n. 18, p. 2373, 2014.
- ATKINSON B. A., KING G. J. & AMOROSO E. C. Development of caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. **Biol. Reprod.**, 1984 30:763774. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2009001000001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009001000001)>. Acesso em: 29 de Nov. 2019.
- BATISTELLA, M. *et al.* **Geotecnologias e gestão territorial da bovinocultura no Brasil.** Embrapa Territorial-Artigo em periódico indexado, 2011. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/901351>>. Acesso em: 7 dez 2019.
- BECHER, B. G. *et al.* Fatores que afetam a produção in vitro de embriões (pive) em bovinos. *Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia*, v.15 n.28; p. 2018. Disponível em: <<https://www.conhecer.org.br/enciclop/2018B/AGRAR/fatores.pdf>>. Acesso em: 12 dez 2019.
- BODEN, D. W. R. **Miniature cattle: For real, for pets, for production.** *Journal of Agricultural and Food Information*, 2008. 9(2), 167–183. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10496500802174036>>. Acesso em: 12 dez 2019
- BOLLONGINO, R. *et al.* Modern Taurine Cattle Descended from Small Number of Near-Eastern Founders. **Molecular Biology and Evolution**, [s.l.], v. 29, n. 9, p.2101-2104, 14 mar. 2012. Oxford University Press (OUP). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mss092>>. Acesso em: 12 Dez 2019.
- BORGES, Á. M. *et al.* **Protocolos hormonais: quando e como utilizá-los?**. 2016. Disponível em: <<http://www.revistaleiteintegral.com.br/noticia/protocolos-hormonais-quando-e-como-utiliza-los>>. Acesso em: 15 dez. 2019.
- BUENO, A. P.; BELTRAN, M. P. **Produção in vitro de embriões bovinos.** 2008. Disponível em: <[http://www.faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/pyqjdj1dprseHFgW\\_2013-6-13-15-24-57.pdf](http://www.faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/pyqjdj1dprseHFgW_2013-6-13-15-24-57.pdf)>. Acesso em: 28 out. 2019.

CAETANO, G., & CAETANO JÚNIOR, M. (2015). **Métodos de detecção de estro e falhas relacionadas**. *PubVet*, 9(8), 381–393. Disponível em: <<https://doi.org/10.22256/pubvet.v9n8.381-393>>. Acesso em: 12 dez 2019.

CARVALHO A. A.; FAUSTINO L. R.; FIGUEIREDO J. R.; RODRIGUES A. P. R., COSTA A. P. R. Vitriificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. **Acta Vet. Bras.**, v.5, p.236-248, 2012.

CAVALCANTI, C. M., CAMPELO, I. S., SILVA, M. M. A. S., ALBUQUERQUE, J. V. S., MELO, L. M., & FREITAS, V. J. F. **Efficiency of different incubation systems for the in vitro production of bovine embryos**, 2018. *Zygote*, 1–5. doi:10.1017/s0967199418000266. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207264>>.

CERVENÁ, A. **Mammals and humans: Domestication and commensals**. In Grzimek's Animal Life Encyclopedia, Edited by Michael Hutchins, Dennis A. Thoney, and Melissa C. McDade. Volume 12: Mammals I. 2nd ed. Detroit: Gale, 2004.

CHAVES *et al.*, **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.34, n.1, p.37-49, jan./mar. 2010. Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)

CHAVES, D. de F. **Protocolo de receptoras de embriões: Índices de aproveitamento de corpo lúteo e taxas de prenhez**. 2014. Disponível em: <[http://nippromove.hospedagemdesites.ws/anais\\_simposio/arquivos\\_up/documentos/artigos/24e86ba499d0ef87bb84ab19053fd2c9.pdf](http://nippromove.hospedagemdesites.ws/anais_simposio/arquivos_up/documentos/artigos/24e86ba499d0ef87bb84ab19053fd2c9.pdf)>. Acesso em: 27 out. 2019.

CRUZ, F. B. *et al.* **Aspiração folicular em vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* e vitrificação dos oócitos em condições de campo**, 2009. Disponível em: <<http://www.revistas.udesc.br/index.php/agroveterinaria/article/view/5328>>. Acesso em: 05 nov. 2019.

DALCIN, L; LUCCI, C. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual, 2010. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 34(3), 149–159. Disponível em: <<http://www.sheepembryo.com.br/files/artigos/406.pdf>>

DENIS, R. **Aspiración folicular in vivo (opu) una nueva perspectiva en el campo de las biotecnologías de la reproducción**. 2008. Disponível em: <[http://www.actaf.co.cu/revistas/Revista%20CIMAGT/Rev.Vol.2%20No.2%202008/Vol.2\(2\)08Denis.pdf](http://www.actaf.co.cu/revistas/Revista%20CIMAGT/Rev.Vol.2%20No.2%202008/Vol.2(2)08Denis.pdf)>. Acesso em: 01 nov. 2019.

DESCÔTEAUX, L.; GNEMMI, G.; COLLOTON, G. **Principles and recommendations in ultrasound imaging**. In: Pratical Atlas of ruminants and camelid reproductive ultrasnography. p. 23-25. 1ª ed. Editora Willey Blackwell USA, 2010.

DIAS, J. C. *et al.* **Alguns aspectos da interação nutrição-reprodução em bovinos: energia, proteína, minerais e vitaminas.** 2010. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/uploads/5e6a812aaa9cf897f45a5758f3662cd8.pdf>>. Acesso em: 05 nov. 2019.

DUKES, H. H. **Fisiologia dos animais domésticos.** 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 926 p. Editoria William O. Reece; Tradução Cid Figueiredo, Idilia Ribeiro Vanzellotti, Ronaldo Farias Frias Zanon.

EMBRAPA, **Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira.** Campo Grande: Embrapa, 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/10180/21470602/EvolucaoQualidadePecuaria.pdf/64e8985a-5c7c-b83eba2d168ffaa762ad>>. Acesso em: 12 dez. 2019.

ENNIS, L. A. **Livestock industry.** In Dictionary of American History. Edited by Stanley I. Kutler. Volume 5, 3rd ed. New York: Charles Scribner's Sons, 2003.

FERNANDES, C. A. C. *et al.* **Eficiência da prostaglandina para sincronização de estro em bovinos em diferentes dias do ciclo estral.** 2005. Disponível em: <<https://www.beefpoint.com.br/eficiencia-da-prostaglandina-para-sincronizacao-de-estro-em-bovinos-em-diferentes-dias-do-ciclo-estral-24684/>>. Acesso em: 02 nov. 2019.

FILHO MESQUITA, J. de. **Aspiração folicular em ruminantes.** 2015. Disponível em: <[file:///C:/Users/Downloads/898-4032-1-PB%20\(6\).pdf](file:///C:/Users/Downloads/898-4032-1-PB%20(6).pdf)>. Acesso em: 26 out. 2019.

FLORA, C. B. Cattle. In Encyclopedia of Food and Culture. Edited by Solomon H. Katz. Volume 1. New York: Charles Scribner's Sons, 2003.

GONÇALVES, P. B. D. *et al.* Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2ª ed., São Paulo, Editora Roca LTDA., 2007. p. 195-224.

GONZALEZ, Kevin. **El ciclo estral de la vaca: REPRODUCCIÓN BOVINA.** 2018. Disponível em: <<https://zoovetespasion.com/ganaderia/reproduccion-bovina/el-ciclo-estral-de-la-vaca/>>. Acesso em: 12 dez. 2019.

GOUVEIA, F. F. A produção *in vitro* de embriões bovinos. Universidade de Brasília. Faculdade de Agronomia e Veterinária, **Monografia.** 35p., 2011.

GRADWOHL, R. H., and Arlene Gradwohl. Personal interview with author, January 22, 2007. Their Web site, International Miniature Cattle Breeders Society and Registry, a division of Cattle Breeders for the Future Corporation. Disponível: <<http://www.minicattle.com/entry.cfm>>. Acesso: 03 dez 2019.

GUEMRA, S., MONZANI, P. S., SANTOS, E. S., ZANIN, R., OHASHI, O. M., MIRANDA, M. S., & ADONA, P. R. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em

meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário, 2013. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 65(6), 1616–1624. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000600005>. Acesso em: 12 dez 2019

GUIMARÃES, Ana Luiza Silva. **Avaliação de diferentes sistemas de maturação para aumentar a competência de ovócitos bovinos**. 2013. 108 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Brasília Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2013.

HAFEZ, B; HAFEZ, E. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri-sp: Manole Ltda, 2004. 513 p.

HENRIQUE, E. A. **SUPEROVULAÇÃO PARA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOS TAURUS INDICUS**. 2007. 57 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais Campus de Poços de Caldas, Poços de Caldas, 2007.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **PPM 2014: rebanho bovino alcança 212,3 milhões de cabeças**. 2017. Estatísticas Econômicas. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/10086-ppm-2014-rebanho-bovino-alcanca-212-3-milhoes-de-cabecas>. Acesso em: 12 dez. 2019.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema de Recuperação Automática (SIDRA). **Efetivo do rebanho brasileiro**, 2018. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>. Acesso em: 28 de Nov. 2019.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. **Anatomia dos animais domésticos: Texto e Atlas Colorido**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 787 p. Tradução Régis Pizzato. König.

KURTZ FILHO, M. *et al.* Maturação e fecundação in vitro de oócitos bovinos em tubos previamente gaseificados e mantidos em banho-maria. **Archives of Veterinary Science** v.7, n.2, p.121-127, 2002.

LEIVAS, F. G. **Influencia da atmosfera gasosa e da fonte proteica sobre o desenvolvimento embrionário in vitro e taxa de prenhez em bovinos**. Tese (doutorado). p. 40-42. Arquivo Centro de ciências rurais da universidade federal de Santa Maria, 2006.

MELLO, R. R. C. **Utilização da gonadotrofina coriônica equina (eCG) em protocolos de sincronização da ovulação para IATF em bovinos: revisão**, 2014. Disponível em: [http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v38n3/pag129134%20\(RB503\).pdf](http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v38n3/pag129134%20(RB503).pdf). Acesso em: 30 out. 2019.

MOORE, S. G., & HASLER, J. F. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. **Journal of Dairy Science**, 2017. 100(12), 10314–10331. doi: 10.3168/jds.2017-13138 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030217310366>.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L. TORTORELLA, R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 418, Brasília – DF, 2010.

OLIVEIRA E. C., DELGADO R. C., ROSA S. R., SOUSA P. J. O. P., NEVES L. O. Efeitos do estresse térmico sobre a produção de bovinos de leite no município de Marilândia, ES. **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.16, p.913-9, 2013

REECE, W. O. **Anatomia funcional e Fisiologia dos animais domésticos**. 3. ed. São Paulo: Roca, 468 p. Tradução de: Clarisse Simões Coelho, Vinicius Ricardo Cuña de Souza, 2019.

RENESTO, A. COELHO, L. A. Associação de biotécnicas: Aspiração folicular guiada por ultrassom e superovulação na produção in vitro e in vivo de embriões bovinos. Tese (Mestrado). Arquivos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP. São Paulo, 2007.

ROHTER, L. **Mexican rancher breeds miniature cows**. New York Times December 29, 1987 Disponível em: <<http://query.nytimes.com/gst/fullpage.html?res=9B0DE4DE1F31F93AA15751C1A961948260>>. Acesso em: 03 de out. 2019.

ROSA P. R. A. Proteínas ligantes dos receptores de fatores de crescimento em complexo cumulus-oócito bovino. 2011. **Dissertação** (Mestrado em Fisiopatologia da Reprodução) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2011.

SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M. M. **Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina**. 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S151635982010001300047](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151635982010001300047)>. Acesso em: 05 nov. 2019.

SCANAVEZ, A.L.; CAMPOS, C.C.; SANTOS, R.M. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, n.3, p.722-728, 2013.

SERAPIÃO, R. V., SÁ, W. F. DE, FERREIRA, A. DE M., CAMARGO, L. S. DE A., GILARDI, S. G. T., VIANA, J. H. M., NOGUEIRA, L. A. G. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro, (2005). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, 12(1–3), 58–61. Disponível em: <<https://doi.org/10.4322/rbcv.2014.303>>. Acesso em: 12 Dez 2019.

SPELL, A. R. et al. Evaluating recipients and embryo factors that affect pregnancy rates transfer in beef cattle. **Theriogenology**. p. 287-297, 2001.

VIANA, J. H. M. **Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo**. 2013. Embrapa Gado de Leite. Disponível em: <<https://pt.engormix.com/pecuaria-leite/artigos/classificacao-embrioes-bovinos-produzidos-t37792.htm>>. Acesso em: 15 dez. 2019.

