



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

Paula de Oliveira Figueiredo

**PRODUÇÃO DE EMBRIÕES EM VACAS INDUBRASIL COMPARANDO AS
TÉCNICAS *IN VIVO* E *IN VITRO***

**TCC apresentado para a conclusão do Curso de
Medicina Veterinária da Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília**

Brasília DF

2015



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

Paula de Oliveira Figueiredo

**PRODUÇÃO DE EMBRIÕES EM VACAS INDUBRASIL COMPARANDO AS
TÉCNICAS *IN VIVO* E *IN VITRO***

**TCC apresentado para a conclusão do Curso de
Medicina Veterinária da Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília**

**Orientador
Ivo Pivato**

**Brasília DF
2015**

Ficha Catalográfica

Figueiredo, Paula de Oliveira

Produção de embriões em vacas Indubrasil comparando as técnicas *in vivo* e *in vitro*. / Paula de Oliveira Figueiredo, orientação de Ivo Pivato. – Brasília, 2015.

44 p.

Monografia – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2015.

1. Reprodução. 2. Zebuino. 3. superovulação. 4. PIV. I. Pivato, I. II. Produção de embriões em vacas Indubrasil comparando as técnicas *in vivo* e *in vitro*.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Paula de Oliveira Figueiredo

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Produção de embriões em vacas Indubrasil comparando as técnicas *in vivo* e *in vitro*.

Ano: 2015

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. A autora reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

(Assinatura)

Paula de Oliveira Figueiredo

CPF: 103.340.756-96

Endereço: AOS 05 Bloco B Apartamento 212

CEP – Cidade/UF – País: 70.660-052 – Brasília/DF – Brasil.

Telefone: 8226-3207

E-mail: paulinha.ofigueiredo@hotmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: FIGUEIREDO, Paula de Oliveira

Título: Produção de embriões em vacas Indubrasil comparando as técnicas *in vivo* e *in vitro*.

Monografia de conclusão do Curso de Medicina Veterinária apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico à minha mãe, Janice e ao meu pai,
Alexandre, por me apoiarem e me incentivarem
em minhas decisões

Agradecimento

A deus, por ter me dado a chance de me formar em uma ótima universidade.

Aos meus pais, Janice e Alexandre, que sempre se preocuparam em me proporcionar uma ótima formação acadêmica e estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando a chegar até aqui.

Ao meu irmão, Guilherme, meu tio, Igor, minha avó, Ivone, e a Fernanda, que souberam lidar com as preocupações e períodos de estresse durante esses cinco anos. E a todos os familiares que mesmo à distância se fizeram importantes para a minha formação.

Ao Prof. Dr. Ivo Pivato, que me orientou durante os dois últimos anos de curso com a simpatia e tranquilidade de sempre. Agradeço todo o conhecimento que se disponibilizou a transmitir e todo carinho que passou nessa fase.

Ao meu supervisor de estágio, Dr. Carlos Frederico Martins, por permitir que eu desenvolvesse meu projeto, dando todo apoio necessário mesmo com as dificuldades enfrentadas.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Arruda, pelos ensinamentos e por fazer questão de presenciar momentos importantes tanto de trabalho quanto de distração.

Ao Prof. Dr. Marcelo Santana, que me orientou nos primeiros anos de curso e me passou conhecimento essencial para a vida acadêmica e profissional.

A Heidi e ao Álvaro, que sempre estiveram dispostos a passar seus conhecimentos e a ajudar no que fosse preciso.

Aos mestrandos, doutorandos, funcionários e estagiários que me acompanharam durante o período de estágio no CTZL, agradeço por tornarem essa fase ainda mais gratificante com sua companhia, e por terem me recebido tão bem.

A Thalita, que desde o primeiro dia de faculdade esteve ao meu lado. Obrigada pelas risadas, festas, viagens e também pelas madrugadas de estudo, por escutar as reclamações e pelo apoio e aconselhamento que sempre esteve disposta a dar. Sem sua companhia nada teria sido a mesma coisa.

A todos os meus amigos que tive o prazer de conviver durante esses 5 anos de faculdade, Rafa, Joãozinho, Raia, Arthur, Paty, Rayssinha, Beto, Thiego, Lucat, Camilla, Lilian, Ana, Igor, Carolzinha, Kamilla, 21 e Laurinha. Estudando e rindo juntos, emprestando resumos minutos antes de uma prova, dividindo conhecimentos a todo momento, amparando e sendo amparada ao receber as notas. Agradeço por me

permitirem estar presente tanto nas horas tristes, cansativas e estressantes, quanto nas horas alegres, de festas e de descanso.

As minhas amigas, Aninha, Lorena, Lais e Dani, obrigada por estarem presentes nos momentos mais importantes da minha vida.

Ao Victor, que procura sempre me fazer rir e está comigo em todos os momentos. Obrigada também por me ouvir, me apoiar e me acalmar mesmo com tantas preocupações.

Às demais pessoas que posso não ter mencionado, mas que colaboraram de alguma forma para o meu aprendizado e para a finalização do curso.

Resumo

Figueiredo, P. O. **Produção de embriões em vacas Indubrasil comparando as técnicas *in vivo* e *in vitro***. Embryo production in Indubrasil breeds comparing *in vivo* and *in vitro* techniques. 2015. 44 p. Monografia - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

O objetivo desse experimento foi comparar a produção de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* quanto a quantidade e qualidade. Foram utilizadas sete vacas da raça Indubrasil, com idades entre 7 e 12 anos, em regime de pastejo e escore corporal 5, na escala de 1 a 5. Para a comparação, as vacas submetidas a produção *in vivo* de embriões passaram por um protocolo superovulatório, em que foi colocado o implante intravaginal de progesterona (Primer, Tecnopec –Agener) no D0, junto com a aplicação de 2ml de benzoato de estradiol. A partir do D4 começaram as aplicações de FSH (Folltropin – Bioniche), de 12 em 12 horas, em oito doses decrescentes por quatro dias, ou seja, 40% no primeiro dia, 30% no segundo, 20% no terceiro e 10% no quarto dia. Foram feitas duas aplicações de prostaglandina junto a sexta e oitava doses de FSH e no mesmo horário da sétima dose de FSH foi retirado o implante de progesterona. As seis vacas foram divididas em dois grupos (T1 e T2), sendo que no primeiro foi administrado 133mg de FSH e no segundo 160mg. Para a produção *in vitro* (PIV) foi feita a aspiração folicular guiada por ultrassom em três vacas que passaram pelo procedimento da produção *in vitro* e em uma que não passou por nenhum procedimento. Nessas vacas não foi aplicado nenhum protocolo de superovulação ou sincronização de cio. Os ovócitos aspirados foram levados ao laboratório para passar pelos procedimentos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, que são responsáveis pela capacitação dos ovócitos e desenvolvimento dos embriões. Os dados obtidos foram apresentados em forma numérica e de média e desvio padrão. Na comparação dos tratamentos superovulatórios para produção *in vivo* foi obtida uma média de 5 ± 0 e $10,67 \pm 6,43$ no T1 e no T2, respectivamente. A taxa de recuperação embrionária em relação a quantidade de corpos lúteos foi de 50% no grupo T1, com média $2,5 \pm 3,53$, e de 18,75% no grupo T2, com média $2 \pm 2,65$. A média geral dos grupos T1 e T2 foram, respectivamente, $2,2 \pm 2,59$. Na aspiração folicular foram recuperados um total de 35 ovócitos, uma média de $11,67 \pm 10,50$ por vaca. A taxa de clivagem, foi de 74,3% e de blastocistos, foi de 28,5%, com média de

3,33 ± 2,08 embriões por vaca. Inferimos que os animais da raça Indubrasil produzem resultados semelhantes às raças que deram origem a sua formação, a Gir e a Guzerá e inferiores a Nelore. Também foi verificado, que animais com melhor crescimento folicular produzem melhores resultados. A dose de FSH na superovulação interfere nos resultados da produção *in vivo*. A PIVE é uma boa alternativa para multiplicação dos animais desta raça, por ter quantidade média de embriões por vaca maior do que na TETF. Este foi o primeiro estudo comparando os dois métodos de produção de embriões na raça Indubrasil.

Palavras chave: Reprodução, Zebuino, Superovulação, PIV

Abstract

Figueiredo, P. O. **Embryo production in Indubrasil breeds comparing *in vivo* and *in vitro* techniques.** Produção de embriões em vacas Indubrasil comparando as técnicas *in vivo* e *in vitro*. 2015. 44 p. Monografia - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

The aim of this experiment was to compare the production of *in vivo* and *in vitro* embryos as for quantity and quality. Seven cows Indubrasil breed were used, with ages between 7 to 12 years, in grazing regime and body condition score 5, range 1-5. For comparison, the cows submitted to *in vivo* production of embryos were submitted to a superovulation protocol. The progesterone implant (Primer, Tecnopec –Agener) were placed in D0, with the application 2ml estradiol benzoate. Since D4 started the applications of FSH (Folltropin – Bioniche), 12 in 12 hours in eight decreasing doses for four days, so 40% on the first day, 30% on the second, 20% on the third and 10% on the fourth day. There were two prostaglandin applications along the sixth and eighth FSH dose, and at the same time, the seventh FSH application the progesterone implant was removed. The six cows were divided into two groups (T1 and T2), the first of which was given 133mg of FSH and the second 160mg. For *in vitro* production (IVP) was made ultrasonically guided follicular aspiration in three cows that have passed through the *in vitro* production procedure and one that has not gone through any procedure. In this cows none superstimulation or synchronization protocols was applied. Aspirated oocytes were taken to the laboratory to get through the procedures of maturation, fertilization and *in vitro* culture, which are responsible for oocyte

capacitation and embryo development. The data obtained were presented in numerical, media and standard deviation form. Comparing the superovulatory treatments for production *in vivo* was obtained an average of 5 ± 0 and 10.67 ± 6.43 at T1 and T2, respectively. The embryo recovery rate against the number of corpora lutea was 50 % in T1 group, averaging 2.5 ± 3.53 , and 18.75% in T2, averaging of 2 ± 2.65 . The overall average of T1 and T2 groups was, respectively, 2.2 ± 2.59 . In vacuum were recovered 35 oocytes, an average of 11.67 ± 10.50 per cow. Cleavage rate was 74.3% and blastocysts, was 28.5 % with an average of 3.33 ± 2.08 embryos per cow. It was inferred that the animals of the race Indubrasil produce similar results to the races that led to its formation, the Gir and Guzerá and inferior to Nelore. It was also found that animals with better follicular grow produce better results. The FSH dose in superovulation interferes with the results of the *in vivo* production. The IVP is a good alternative to multiplication of animals of this breed, having an average number of embryos per cow higher than in FTET. This was the first study comparing the two embryo production methods in Indubrasil race.

Key words: Reproduction, Zebu, Superstimulation, IVP

Sumário

1. Introdução	12
2. Objetivos	14
3. Materiais e Método	15
3.1. Protocolos hormonais	15
3.2. Procedimentos para coleta de embrião	16
3.2.1. Inseminação Artificial em tempo fixo (IATF)	16
3.2.2. Avaliação ovariana e coleta de embriões	17
3.2.3. Rastreamento e classificação dos embriões	19
3.3. Procedimentos para a produção <i>in vitro</i> (PIV)	19
3.3.1. Aspiração folicular	19
3.3.2. Filtragem, rastreamento e classificação dos ovócitos	20
3.3.3. Maturação <i>in vitro</i>	21
3.3.4. Fecundação <i>in vitro</i>	22
3.3.5. Cultivo <i>in vitro</i>	23
4. Resultados e discussão	24
5. Conclusão	30
6. Referências Bibliográficas	29
7. Relatório de estágio	33
7.1. Introdução	33
7.2. Identificação de estágio	34
7.3. Plano de Trabalho	34
7.4. Atividades Desenvolvidas	34
7.4.1. Exame andrológico	36
7.4.2. Coleta de sêmen	36
7.4.2.1. Coleta de sêmen em bovinos	36
7.4.2.2. Coleta de sêmen em felinos	37
7.4.3. Congelamento de sêmen bovino e felino	37
7.4.4. Diagnóstico de gestação e ultrassonografia	37
7.4.5. Realização de protocolos hormonais	38
7.4.6. Inseminação Artificial por Tempo Fixo (IATF)	38
7.4.7. Aspiração folicular	38

7.4.7.1. Aspiração folicular de ovócitos obtidos de ovários de abatedouro	38
7.4.7.2. Aspiração folicular de ovócitos <i>in vivo</i>	39
7.4.8. Produção <i>in vitro</i> de embriões	40
7.4.8.1. Maturação <i>in vitro</i>	40
7.4.8.2. Fecundação <i>in vitro</i>	40
7.4.8.3. Cultivo <i>in vitro</i>	41
7.4.8.4. Finalização do processo de PIV	41
7.4.10. Transferência de embriões	41
7.4.11. Transferência nuclear	42
7.4.12. Outros	42
7.5. Considerações finais	43

1. Introdução

Antigamente, o melhoramento genético privilegiava o macho, com a escolha de características específicas de touros que eram utilizados na inseminação artificial (IA). Com o uso da ultrassonografia, foi possível estudar de forma detalhada o modelo de crescimento folicular nesta espécie, o que possibilitou o avanço das biotécnicas da reprodução animal. Hoje em dia é possível obter vários descendentes a partir de uma fêmea geneticamente superior em um curto intervalo de tempo, com a utilização de técnicas que associam a superovulação, inseminação artificial e transferência de embriões, a produção de embriões *in vitro* (PIV) e várias outras (Ereno et al., 2002).

Com o conhecimento adquirido sobre a dinâmica folicular, desenvolveu-se protocolos onde manipula-se o crescimento dos folículos, e permite que a inseminação artificial seja realizada em tempo predeterminado (inseminação artificial em tempo fixo – IATF), ou seja, sem a necessidade de observação do estro comportamental (cio). A identificação do cio é um dos fatores que causa maior interferência na implantação da técnica de inseminação artificial, pois requer mão de obra especializada, por isso, essa conquista foi importante para ajudar na expansão de programas de inseminação artificial, principalmente no gado zebuino. Tais conhecimentos melhoraram, também, a aplicabilidade de protocolos superovulatórios empregados na transferência de embriões (Ereno et al., 2002).

Os embriões originados de raças zebuínas têm maior sensibilidade a criopreservação e o estágio de desenvolvimento embrionário relativamente mais avançado quando coletados no sétimo dia de animais superovulados que os embriões produzidos por raças taurinas (Prado et al., 2006). Ainda não é possível explicar o motivo, porque a maior parte das metodologias e biotecnologias desenvolvidas e utilizadas na obtenção e criopreservação de embriões foram desenvolvidas em taurinos, sendo necessários mais estudos que atendam às peculiaridades fisiológicas dos zebuínos (Fonseca et al., 2001).

Uma das principais razões para o sucesso da produção *in vitro* de embriões em gado zebu é a maior população de folículos antrais presentes em *B. indicus* que em *B. taurus*. Por essa razão, acaba rendendo um maior número de ovócitos durante a OPU, e consequentemente, o número de embriões produzidos também é maior (Sartori et al., 2011). Na literatura não há evidências de que a superovulação aumente

o número de ovócitos aspirados em animais da raça Nelore, B. indicus (Monteiro et al., 2010).

Segundo a Associação dos criadores Gaúchos de Zebu (ACGZ) a raça Indubrasil é resultado de cruzamentos do Gir, Guzerá e Nelore, feito por criadores e pesquisadores para unir as melhores características do gado zebu em uma única raça. A raça também é conhecida pelos nomes Induberaba, Induaraxá, Indubahia, Induporã, entre outros.

O gado Indubrasil é dócil, rústico e de dupla aptidão, por isso tem sido cruzado com animais zebuínos e taurinos de corte e de leite. Acrescenta características como a alta produção de leite, longevidade das vacas, docilidade, excelente conversão alimentar, habilidade materna, excelente desempenho nos confinamentos e grande heterose nos cruzamentos.

O primeiro registro genealógico da raça foi datado em 1938, e, na mesma data, estabelecido o padrão racial pela Sociedade Rural do Triângulo Mineiro. Dados da ACGZ apontam que a raça dominou a pecuária brasileira entre os anos de 1925 e 1945 e chegou a representar 79,8% do total nacional em 1940. Em 1946, o gado Indubrasil foi exportado para os Estados Unidos para contribuir no desenvolvimento da raça Brahman. Em 1980, devido a ascensão de outras raças, diminuiu consideravelmente para 3,7% o total registrado no Brasil, com boa parte das matrizes utilizadas em cruzamentos leiteiros.

Atualmente, o gado apresenta crescimento significativo nas regiões sudeste e centro-oeste, e maior mercado de sêmen no Rio Grande do Sul. Isso é consequência da evolução genética pela seleção e investimentos em pesquisas e programas de melhoramento.

Existe uma carência muito grande de estudos, necessários para conhecer a fisiologia dos eventos reprodutivos e o potencial de produção de embriões, para favorecer tanto o melhoramento genético quanto a reprodução animal. Para a expansão da raça, as biotécnicas reprodutivas, como a transferência de embriões *in vivo* e, principalmente, *in vitro* devem ser muito utilizadas, para promover um rápido aumento do rebanho (Martins et al. 2011)

2. Objetivos

Esse trabalho teve como objetivo comparar a quantidade de embriões produzidos *in vivo* em vacas superovuladas e *in vitro* pela FIV (fecundação *in vitro*) na raça Indubrasil. para saber qual é a melhor forma de reproduzir rapidamente o rebanho.

3. Materiais e Métodos

Nesse experimento foram utilizadas sete vacas da raça Indubrasil com idades entre 7 e 12 anos, pesos entre 500 e 650Kg, todas com escore corporal 5, na escala de 1 a 5. As vacas se encontravam em regime de pastagem de *Brachiaria brizantha* cv *Piatã*, sal mineral e água *ad libitum*.

Todos os animais passaram por avaliações ultrassonográficas com transdutor linear trans retal de 7,5 MHZ em equipamento portátil da marca HONDA, modelo HS-1500 nos dois experimentos. As vacas que apresentaram cistos ou quaisquer outras enfermidades foram descartadas do estudo.

Seis vacas foram separadas para passar pelo protocolo de superovulação e foram divididas em dois grupos (T1 e T2), onde foram aplicadas diferentes doses hormonais para comparação. Dessas seis vacas, três, e mais uma que não passou pelo procedimento de superovulação e coleta de embriões, foram submetidas a aspiração folicular guiada por ultrassom, para posteriormente ser feita a PIV.

3.1. Protocolos hormonais

No dia seguinte à realização das imagens ultrassonográficas, foram selecionadas 6 vacas para fazer a indução da superovulação com tratamento à base de FSH e coleta de embriões em tempo fixo (SOVTF). As vacas foram divididas em dois grupos de três e passaram pelo mesmo protocolo, diferenciando apenas na dosagem hormonal que receberam durante o tratamento.

O protocolo utilizado para a SOVTF foi o seguinte: No D0 foi colocado o implante intravaginal de progesterona (Primer, Tecnopec –Agener) e aplicada uma injeção de 2mg de benzoato de estradiol; a partir do D4 foram feitas aplicações de FSH (Folltropin – Bioniche) de 12 em 12h, durante quatro dias (8doses), com doses decrescentes a cada dia, ou seja, 40% da dose total no primeiro dia, 30% no segundo, 20% no terceiro e 10% no quarto e último dia; no D6 e no D7, junto à sexta e oitava doses de FHS foi aplicado prostaglandina F₂α; ainda no D7, foi retirado o implante de progesterona de manhã, no mesmo horário de injeção da sétima dose de FSH (Figura 1).

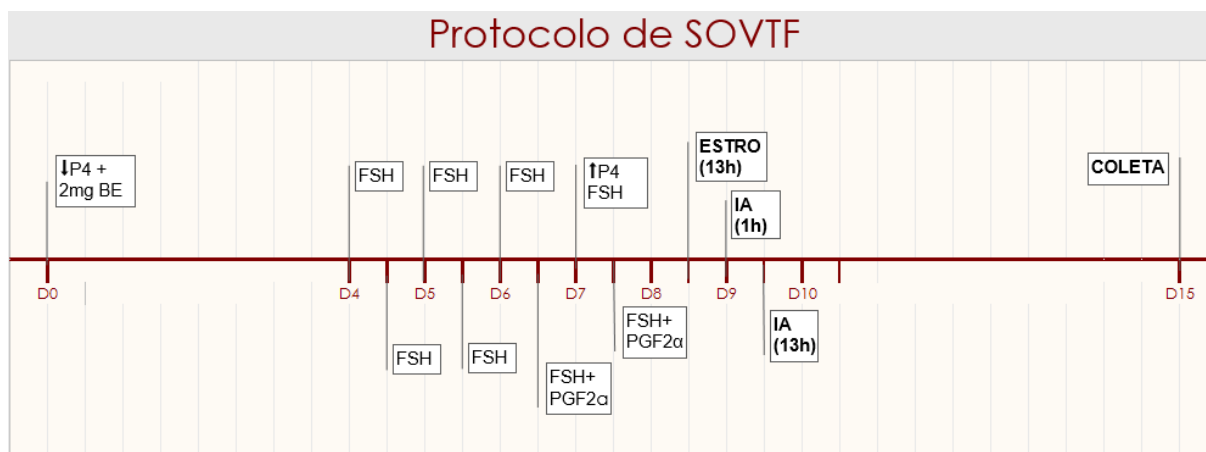


Figura 1: Representação esquemática do protocolo de superovulação utilizado nas vacas, sendo ↓P4 (colocação do implante intravaginal de progesterona), ↑P4 (retirada do implante intravaginal de progesterona), BE (benzoato de estradiol), FSH (hormônio folículo estimulante), IA (inseminação artificial), Coleta (coleta de embriões).

O tratamento 1 (T1) de superovulação foi feito com 133mg de FSH e o tratamento 2 (T2) com 160mg de FSH. Para separar essa dosagem, foi feita a diluição inicial do liofilizado com 20ml de diluente, obtendo 20mg/ml de FSH. Dessa solução foi retirado 6,6ml para o T1 e 8ml para o T2. Nos dois casos a solução foi completada para 20ml com solução fisiológica e divididos em 4ml + 4ml para o primeiro dia de aplicação, 3ml+3ml para o segundo dia, 2ml+2ml para o terceiro dia e 1ml+1ml para o último dia.

3.2. Procedimentos para coleta de embrião

3.2.1. Inseminação artificial em tempo fixo (IATF)

As vacas manifestaram cio no D8 (Figura 2), à 13h da tarde, 30h após a retirada do implante intravaginal de progesterona. A inseminação foi feita 12h depois, na madrugada do D8 para o D9, com a segunda inseminação 12h após a primeira.



Figura 2 – Manifestação de cio das vacas após o protocolo de sincronização. (A) Reflexo de Fleming. (B) Aceitação de monta.

Para as inseminações artificiais foi usado sêmen do touro Matuto, da raça Indubrasil, de seleção leiteira, que foi classificado com motilidade 70% e vigor 4.

Primeiramente foi feita a assepsia da vulva das vacas a serem inseminadas, lavando com água e álcool 70%, sem necessidade de aplicar anestesia. O sêmen foi retirado do botijão e colocado diretamente em água aquecida de 36 – 37°C, por no mínimo 30 segundos. O aparelho de inseminação foi montado, introduzido na vagina da vaca e guiado com a mão, pelo reto, a passar pela cérvix uterina. O sêmen foi depositado no corpo do útero e foi feita massagem no clitóris para estimular a ovulação.

3.2.2. Avaliação ovariana e coleta de embriões

No D15, foi realizada outra avaliação ultrassonográfica, com o mesmo aparelho de ultrassom utilizado para fazer o exame inicial. Os ovários foram analisados quanto a quantidade e tamanho dos corpos lúteos e presença de folículos anovulatórios.

A coleta dos embriões foi feita pela via transcervical em circuito fechado. Para isso, os animais foram anestesiados por via peridural baixa, com anestésico L, Pearson (lidocaína e epinefrina) (Figura 3A). Então, foi feita a assepsia da vulva com água e álcool para evitar contaminação. Foi utilizado um expansor cervical para abrir e alinhar a cérvix, e direcionar a sonda de folley até o útero (Figura 3B). Com a sonda posicionada o balão foi inflado com solução fisiológica, para que ele fique fixo no local desejado.

Foram feitas várias lavagens do útero com PBS aquecido (a quantidade por lavagem depende do tamanho do útero) até que 1 litro fosse utilizado. Na última lavagem o útero permaneceu cheio com PBS, e o animal foi solto para fazer uma relavagem de cada uma das vacas no final.

O recipiente de PBS fica suspenso, ligado a sonda de folley, e o líquido desce até o útero pela força da gravidade, enquanto o médico veterinário controla o fluxo e a quantidade de líquido depositado. Quando o útero está cheio, essa via é fechada e a que leva ao filtro é aberta. O veterinário manipula o útero com massagens e batidas para que o embrião se descole da parede e entre pela sonda para chegar ao filtro. Quem está segurando o filtro deve controlar o fluxo de saída do líquido, para que a superfície não chegue a encostar na tampa e que o filtro não esvazie, para os embriões não se prenderem a rede do fundo (Figura 3C). O filtro possui malha de 50 μ m, o que elimina o risco de um embrião passar pela malha.



Figura 3 – (A) Aplicação de anestesia epidural baixa com lidocaína 2%. (B) Expansor cervical posicionado para passagem da sonda de folley. (C) Realização da coleta de embriões com o recipiente de PBS e o filtro ligados por um conector Y a sonda de folley.

3.2.3. Rastreamento e classificação dos embriões

Os embriões coletados foram levados ao laboratório, com o filtro fechado e revertidos em uma placa petri. O filtro foi, então, lavado com solução de PBS com o auxílio de uma agulha 40x12 acoplada em uma seringa de 20ml. A procura dos embriões foi realizada com o auxílio de um estereomicroscópio SMZ 745 (Nikon®, Japão)

3.3. Procedimentos para a produção *in vitro* (PIV)

3.3.1. Aspiração folicular

Para a realização da aspiração folicular, os animais foram contidos em troncos. Foi feita anestesia epidural baixa com lidocaína 2% e dosagem dependente do peso do animal, após ter sido feita assepsia do local com álcool 70%. A cauda foi presa e a vulva lavada com água e sabão neutro e posteriormente desinfetada com álcool 70% (Figura 4A).

A probe com a guia de aspiração foi introduzida pela vagina e posicionada no fórnix vaginal na direção do ovário a ser aspirado (Figura 4B). Os ovócitos foram coletados por meio de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU), a uma pressão de 80 – 110mmHg, em meio de lavagem produzido no laboratório de reprodução animal do CTZL. As estruturas aspiradas foram levadas imediatamente ao laboratório para filtragem, rastreamento e classificação dos ovócitos e para fazer a produção *in vitro* dos animais (PIV).

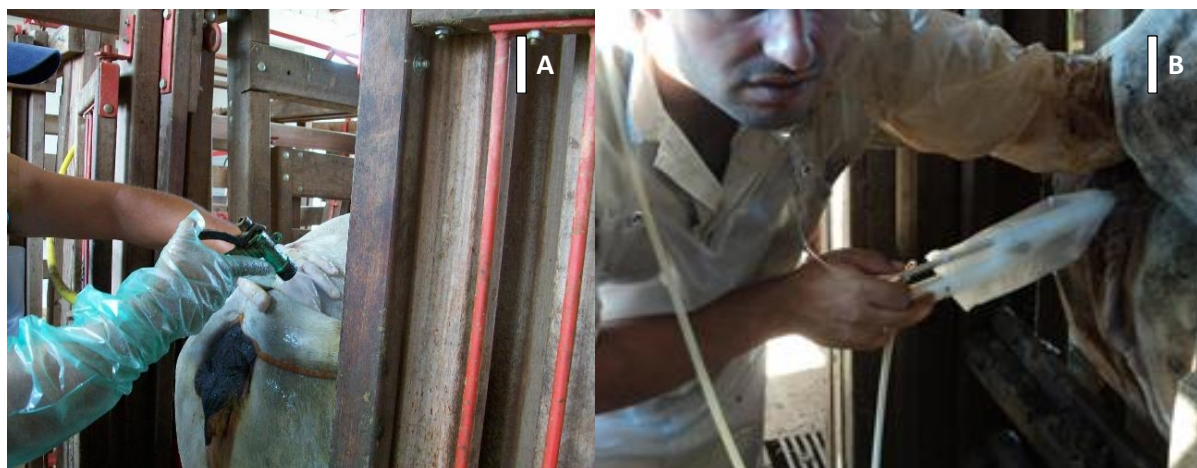


Figura 4 – (A) Higienização da região perineal. (B) Realização da aspiração folicular guiada por ultrassom.

Os equipamentos utilizados nesse processo foram um aparelho de ultrassom modelo SSD-500 (Aloka®, Tóquio-Japão,), acoplado a uma probe setorial micro-convexa UST-5561-7,5 (Aloka®, Tóquio-Japão), com frequência 7,5 MHz, montada em uma guia transvaginal (Aloka®), e uma bomba de vácuo digital BV-003d(WTA®, Brasil), acoplado a um sistema com uma agulha 18G (WTA®, Brasil).

O meio de lavagem utilizado para a coleta foi produzido no laboratório de reprodução animal do CTZL, composto por meio de bancada (TCM 199 sais de Hank`s - Gibco BRLÒ) suplementado com 2,5% de soro fetal bovino (SFB - Gibco BRLÒ), penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (50 mg/ml)) e 1µl/ml de Heparina Sódica (Liquemine® i.v. Roche, Suíça), aquecido a uma temperatura de 36 – 37°C.

3.3.2. Filtragem, rastreamento e classificação dos ovócitos

Os ovócitos aspirados foram mantidos em banho maria a 37°C até a filtragem do conteúdo em um filtro de coleta de embriões com malha de 50 µm e lavagem com PBS aquecido utilizando seringa de 20ml e agulha 40x12. Após a lavagem, a solução foi colocada em uma placa petri de 100x20mm e os ovócitos foram rastreados com o auxílio de um esteriomicroscópio SMZ 745 (Nikon, Japão) (Figura 5).

Depois de rastreados (Figura 5A), esses ovócitos foram colocados em outra placa com meio de lavagem (Figura 5B) e posteriormente classificados quanto a qualidade morfológica intracelular e quantidade e aparência das células do cumulus, em uma escala de I a IV, conforme preconizados por Leibfried e First (1979):

- Grau I: cumulus compacto, contendo mais de três camadas de células. Citoplasma homogêneo, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom.
- Grau II: cumulus compacto, com menos de três camadas de células, podendo estar parcialmente ou completamente presente em volta do ovócito. Citoplasma

possui granulações distribuídas de modo heterogêneo, preenchendo todo o interior da zona pelúcida.

- Grau III: cumulus presente, porém expandido. Citoplasma apresenta-se contraído, não preenchendo todo o espaço perivitelino, degenerado, fragmentado e pode estar vacuolizado.

- Grau IV: Ovócito desnudo, sem células do cumulus.

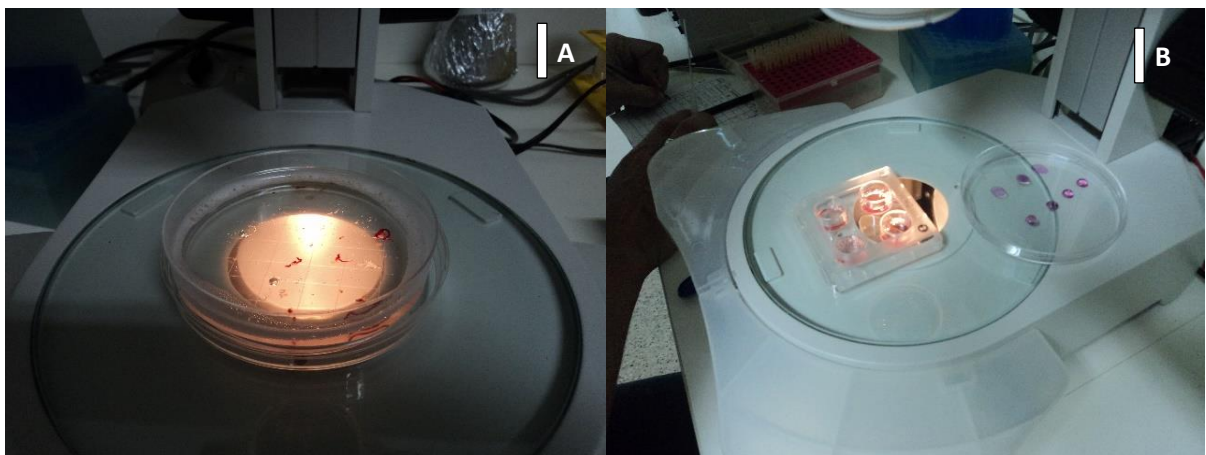


Figura 5 – (A) Rastreamento dos ovócitos. (B) Lavagem dos ovócitos para colocar no meio de maturação.

O meio de lavagem é composto por meio de bancada (TCM 199 sais de Hank's - Gibco BRLÒ) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco BRLÒ), penicilina (100UI/ml) e estreptomicina (50mg/ml)).

3.3.3. Maturação *in vitro*

Depois de passar pela classificação, todos os ovócitos foram colocados em gotas de meio de maturação (MIV) comercial cobertas com óleo mineral. Cada gota pode ter de 25 a 30 ovócitos, separados de acordo com os animais que foram aspirados. A placa foi colocada em uma estufa a 38,5°C, 5% de CO₂ e umidade saturada.

Esse processo deve ser feito para que os ovócitos passem por várias transformações celulares e moleculares e se tornem aptos a fecundação (Gonçalves, 2007).

3.3.4. Fecundação *in vitro*

Para realizar a fecundação *in vitro*, os ovócitos foram lavados em uma gota de 50µl de meio de fecundação (FEC) comercial e depois depositados em outra gota de 50µl de FEC definitiva (Figura 6B), onde foram colocados os espermatozoides, após a capacitação espermática (Figura 6A).

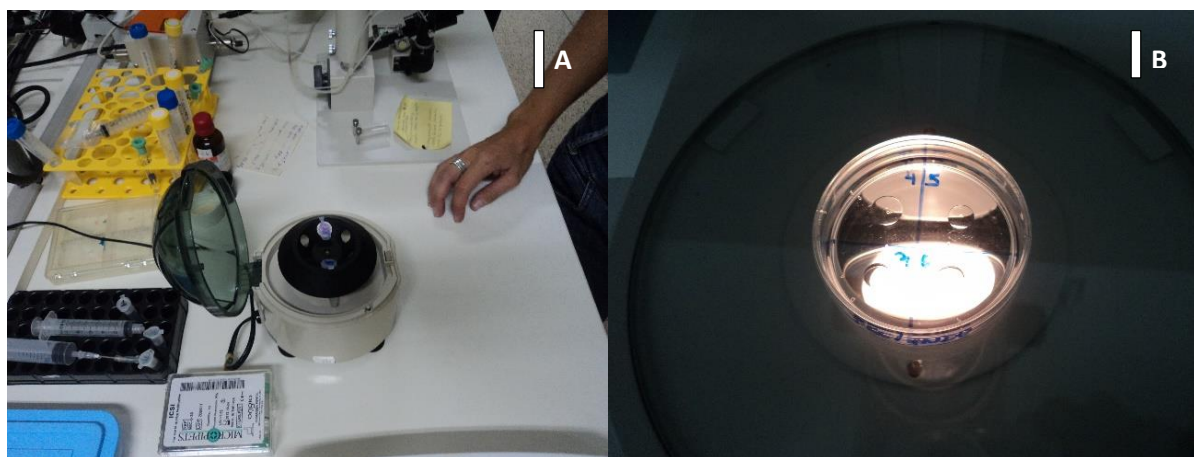


Figura 6 – (A) Realização da capacitação do espermatozoide para fazer a fecundação *in vitro*. (B) Ovócitos colocados em meio de fecundação *in vitro* junto aos espermatozoides.

Inicialmente o sêmen foi retirado do botijão e colocado em água aquecida a 37°C por 30 segundos. Depois de descongelado o sêmen foi avaliado quanto a motilidade e vigor.

A seleção espermática foi feita pelo método do gradiente de Percoll, com 2ml de Percoll 45% e 2ml de Percoll 90% (Parrish et al., 1995). O sêmen foi depositado acima do gradiente de Percoll, previamente preparado e deixado na estufa por pelo menos duas horas, e centrifugado a 6000 rpm por cinco minutos (Figura 6A). O pellet formado foi retirado e ressuspensionado em 1ml de meio CAP (meio de capacitação comercial), que também foi colocado na estufa duas horas antes do processo. O meio com os espermatozoides foi centrifugado novamente a 6000rpm por cinco minutos, e 50µl do pellet de formado, ressuspensionado em 50µl do meio de fecundação (FEC).

Após a capacitação foi realizada outra avaliação dos espermatozoides. Foi colocado 1µl da solução, em concentração de 2×10^6 , de espermatozoides em cada

gota contendo os ovócitos (Figura 6B e 7). Depois desse processo a placa foi colocada novamente na estufa, com as mesmas condições de quando foi feita a MIV.



Figura 7: Ovócitos durante a fecundação *in vitro*.

3.3.5. Cultivo *in vitro*

Após a fecundação (18h), os zigotos foram retirados do meio FIV e lavados em duas gotas de meio SOF (fluido sintético do oviduto), para transferi-los para a gota de cultivo embrionário comercial (CIV). No CIV os zigotos ficaram por mais seis dias, sendo que foram avaliados quanto a taxa de clivagem no segundo dia que já se encontravam na gota, no D4 da Produção *in vitro* (Figura 8).

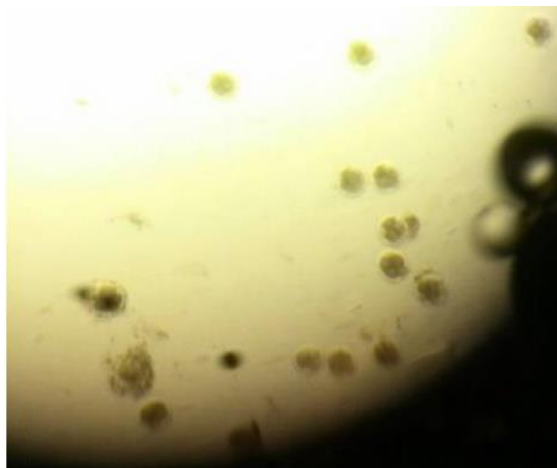


Figura 8: Embriões na fase de clivagem.

As avaliações finais de qualidade e quantidade dos embriões foram feitas no D8 e comparadas aos embriões coletados após inseminação artificial em vacas superovuladas.

4. Resultados e discussão

As seis vacas Indubrasil, foram divididas em dois grupos semelhantes baseado na quantidade de folículos que apresentaram na avaliação ultrassonográfica. Infelizmente, foi descartada uma vaca do estudo, por ter sido detectada como uma vaca problema pelos resultados apresentados e por seu histórico na fazenda.

Foi aplicado o protocolo de superovulação em todas as vacas. Segundo Prado et al. (2006), a fase ovariana no momento do tratamento influencia na resposta superovulatória, por isso várias pesquisas estão sendo conduzidas para elevar o índice de recuperação embrionária em relação a essa característica.

Nesse experimento o protocolo de sincronização foi aplicado concomitantemente a sincronização estral. Os protocolos de sincronização procuram simular a fisiologia reprodutiva do animal e sincronizar o início do desenvolvimento folicular, a luteólise e a ovulação, como descrito por Sartori et al. (2011) e Martins et al. (2011). A combinação dos dois protocolos permite que seja feita a superovulação em tempo fixo (SOVTF) e a coleta de embriões em tempo fixo (TETF) (Martins et al., 2011)

As vacas apresentaram cio 42 horas após a aplicação da primeira dose de prostaglandina e 18 horas após a aplicação da segunda dose (Figura 2). O animal 86, descartado do experimento, não manifestou cio e se manteve afastado do grupo durante essa fase. Esse intervalo está entre o indicado por Martins et al. (2011), que fala que o intervalo $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Estro pode ser de 48 a 96 horas após o tratamento e Gonçalves et al. (2007), que indica que esse mesmo intervalo deve ser de 26 a 28 horas.

As inseminações artificiais foram feitas 12 e 24 horas após a manifestação de cio, como indicado por Prado et al. (2006) e Martins et al. (2011).

No dia da coleta foi realizada avaliação ultrassonográfica dos ovários, onde foi verificado que a maioria das vacas teve múltipla ovulação, devido a presença de corpos lúteos nos ovários. Apesar de haver diferença numérica entre o grupo T1 e o grupo T2 em relação a contagem dos corpos lúteos, não houve diferença estatística ($P>0,05$).

Como podemos observar, o tratamento 1, que utilizou menor dose de FSH (133mg) estimulou de maneira menos eficiente em relação ao tratamento 2 (160mg de FSH). Os tratamentos apresentaram média de 5 ± 0 e $10,67 \pm 6,43$ no T1 e no T2, respectivamente. A tabela 1 mostra os resultados de forma mais explicativa.

Tabela 1: Diferença numérica da quantidade de corpos lúteos por animal e a média de corpos lúteos por vaca de acordo com os tratamentos hormonais com FSH, T1 (133mg) e T2 (160mg), feitos em vacas Indubrasil.

Tratamento	Animal	Ovário	Resultados ultrassonográficos		Média por vaca
T1	70	OD	4 CL	5 CL	5 ± 0
		OE	1 CL		
	195	OD	3 CL	5 CL	
		OE	2 CL		
T2	58	OD	12 CL	18 CL	10,67 ± 6,43
		OE	6 CL		
	211	OD	4 CL	8 CL	
		OE	4 CL		
	62	OD	3 CL	6 CL	
		OE	3 CL		
Total			42 CL		8,4 ± 5,50

CL: corpos lúteos; OD e OE: ovário direito e ovário esquerdo; T1: 133mg de FSH; T2: 160mg de FSH

Posteriormente a ultrassonografia, foi feita a coleta dos embriões, que resultou na recuperação de 11 estruturas viáveis (Figura 9), sendo que em um dos animais não foi possível fazer a coleta, por não passar a cervix. Ainda teve outro animal, que por ter caído no brete, não foi feita a relavagem.



Figura 9: Embrião gerado pela produção *in vivo* e coletado no sétimo dia.

No grupo T1 foram coletados, no total, 5 embriões, sendo que dois foram recuperados na recoleta. No grupo T2, apesar de apresentar número muito maior de corpos lúteos, foram recuperados apenas 6 embriões, entre eles, um na recoleta. A taxa de recuperação embrionária em relação a quantidade de corpos lúteos, foi de 50% no grupo T1, e de 18,75% no grupo T2. A média da recuperação de embriões foi de $2,5 \pm 3,53$ e $2 \pm 2,65$ nos grupos T1 e T2, respectivamente, onde a média geral foi $2,2 \pm 2,59$, semelhante ao encontrado por Prado et al. (2006), que foi de 2,29 embriões viáveis por doadora. Não houve diferença estatística entre os dados ($P>0,5$).

Assim como mencionado em Cruz et al. (2008) e Castro Neto et al. (2005), podemos observar que o número de recuperação embrionária é muito inferior ao número de corpos lúteos, apresentando grandes variações nessa taxa (20 a 80%), por isso tem-se feito a recoleta. É possível que essa técnica promova o relaxamento e distensão da parede uterina que associados a presença de líquido no seu interior e ao movimento do animal, contribuam para desfazer possíveis dobras e dissolvam secreções mucosas, liberando estruturas que ficariam retidas durante o procedimento convencional (Cruz et al., 2008; Castro Neto et al., 2005).

Tabela 2: Representação numérica dos embriões recuperados na coleta e na recoleta, taxa de recuperação dos embriões em relação a quantidade de corpos lúteos e média da quantidade de embriões recuperados por animal em vacas Indubrasil superestimuladas com FSH nos tratamentos T1 (133mg) e T2(160mg).

Tratamento	Animal	Recuperação embrionária			Taxa de recuperação		Média
		Coleta	Recoleta	Total	(%)		
T1	70	3	2	5	100	50	2,5 ± 3,53
	195	-	-	-	0		
T2	58	5	0	5	27,8	18,75	2 ± 2,65
	211	0	1	1	12,5		
	62	0	-	0	0		
Total		8	3	11	26,8		2,2 ± 2,59

T1: 133mg de FSH; T2: 160mg de FSH

As quatro vacas que foram submetidas a PIVE receberam uma única sessão de aspiração folicular (AF). Elas não passaram por nenhum tratamento de sincronização, ou qualquer outro procedimento, por isso estavam em diferentes fases do ciclo estral, e conseqüentemente, apresentavam uma variação muito grande de quantidade folicular. A vaca problema também passou por esse procedimento e foi descartada dos resultados.

Monteiro et al. (2010) recomenda a ablação dos folículos maiores pelo menos dois dias antes da aspiração, para que o pool de folículos antrais presentes se desenvolvam e não entrem em atresia devido a dominância.

No momento da aspiração os folículos foram somados para dar uma estimativa de quantidade de estruturas recuperadas em cada animal para facilitar o rastreamento dos ovócitos. Essa estimativa foi de 20, 10, e 2, e se aproximou do número real de ovócitos rastreados no laboratório, que foi de 22, 12 e 1, respectivamente. A aspiração resultou na recuperação de um total de 35 ovócitos, com uma média de $11,67 \pm 10,50$ ovócitos por vaca (Tabela 3). Para Palma et al. (2008) a eficiência da punção pode variar em função do operador de 5,4 a 9,8 embriões por vaca, índice inferior ao encontrado nesse trabalho.

Tabela 3: Relação entre a média de ovócitos GIII e GIV e a média total dos ovócitos aspirados por guia transvaginal em vacas Indubrasil.

Animal	Aspirados	Recuperados				
		Total	GI	GII	GIII	GIV
Filha 62	20	22	0	0	6	16
58	10	12	0	0	7	5
70	2	1	0	0	0	1
Total	32	35	0	0	13	22
Média	$10,67 \pm 9,02$	$11,67 \pm 10,50$			$4,33 \pm 3,79$	$7,33 \pm 7,77$

A maturação *in vivo* se inicia com o pico de LH, que promove o desenvolvimento do ovócito do estado de prófase I para metáfase II. Na produção *in vitro* essa fase de pico de LH não ocorreu ainda, por isso os ovócitos se encontram em diferentes fases

de desenvolvimento, por serem aspirados de folículos de diversos tamanhos (Palma et al., 2008). A maturação se inicia assim que perde o contato com as células foliculares. Os ovócitos adquirem progressivamente a capacidade de completar a maturação nuclear, citoplasmática e suportar o desenvolvimento embrionário até a fase final de crescimento folicular (Gonçalves et al., 2007).

A maturação *in vitro* é afetada por diversos fatores que podem diminuir a eficiência da fecundação e o desenvolvimento embrionário posterior. Entre esses fatores estão a origem dos ovócitos (dependendo do tamanho do folículo que foram aspirados), saúde e integridade dos folículos (atresia, dominância) da idade, estado nutricional e estado sexual da doadora, da comunicação entre o ovócito e as células do cumulus, estimulação do folículo e das condições de cultivo *in vitro* (Palma et al. 2008).

Para realizar a fecundação, os espermatozoides devem passar pela capacitação espermática (Figura 6A), que segundo Gonçalves et al. (2007), causa uma desestabilização da membrana plasmática sem modificações morfológicas, com a remoção de algumas proteínas e alterações bioquímicas. Esse procedimento resulta em uma hiperativação espermática, que permite sua penetração no ovócito. Como resultado o espermatozoide teve uma melhora de sua motilidade em 10%, passando de 70 para 80% e o vigor passou de 4 para 5.

De acordo com Gonçalves et al. (2007), o cultivo *in vitro* (CIV), conhecido como “transição maternozigótica”, dura aproximadamente sete dias, que o embrião chega ao estágio de mórula (8 – 16 células) e ocorre a ativação do genoma embrionário. Alguns estudos mais recentes falam, ainda, que essa transição pode ocorrer a partir do estágio de duas células. O desenvolvimento dos embriões, nessa fase, depende da qualidade dos ovócitos e das condições do cultivo, e por essas razões podem desenvolver alterações, durante o cultivo, na morfologia, no conteúdo cromossômico, na expressão gênica, no metabolismo e na apoptose, podendo impedir o desenvolvimento do embrião até a fase blastocística (Palma et al. 2008).

A taxa de clivagem, foi de 74,3% e de blastocistos, foi de 28,5%, com média de $3,33 \pm 2,08$ embriões por vaca. A taxa de clivagem e de blastocisto foi calculada em relação a quantidade de ovócitos coletados, e foram semelhantes as expostas por Palma et al. (2008). Os resultados são mostrados na tabela 4.

Tabela 4: Representação das taxas de clivagem e de formação de blastocisto por animal e geral em relação a quantidade de ovócitos aspirados por guia transvaginal de vacas Indubrasil.

Animal	Ovócitos	Clivagem	Blastocisto		
			Bi	Bl	Total
Filha 62	22	14 (63,6%)	3	1	4 (18%)
58	12	11 (91,6%)	4	1	5 (42%)
70	1	1 (100%)	1	0	1 (100%)
Total	35	26 (74,3%)	8	2	10 (28,5%)
Média	11,67 ± 10,50	8,67 ± 6,81	2,67± 1,53	0,67± 0,58	3,33 ± 2,08

Podemos observar que comparando os resultados da produção de embrião *in vivo* e *in vitro*, as taxas foram um pouco maiores na PIVE. A média de embriões por vaca na PIVE foi de 3,33 ± 2,08, enquanto na coleta de embriões *in vivo* foi de 2,2 ± 2,59. Esse resultado, no entanto, não apresentou diferença estatística ($P > 0,05$).

Devemos lembrar que a PIVE pode ser feita 6 vezes, de 15 em 15 dias. A PIVE tem algumas limitações, como a dificuldade de desenvolver um método mais eficiente de maturação *in vitro*, a raça, nutrição e estado fisiológico do animal. Trabalhos estão sendo desenvolvidos atualmente para melhorar esses métodos de MIV e facilitar o transporte com métodos simples de incubação e criopreservação, que são as maiores dificuldades na PIVE (Gonçalves et al., 2007).

5. Conclusão

É possível inferir que os animais da raça Indubrasil produzem resultados semelhantes às raças que deram origem a sua formação, a Gir e a Guzerá e inferiores a Nelore.

Também foi verificado, que animais com melhor crescimento folicular produzem melhores resultados.

A dose de FSH na superovulação interfere nos resultados da produção *in vivo*.

A PIVE é uma boa alternativa para multiplicação dos animais desta raça, por ter quantidade média de embriões por vaca maior do que na TETF.

6. Referências Bibliográficas

ASSOCIAÇÃO DOS CRIADORES GAÚCHOS DE ZEBU. Disponível em <http://www.acgz.com.br/secao_racas.php?pagina=6>. Acesso em: 15 maio 2015.

Castro Neto, A.S., Sanches, B.V., Binelli, M., Seneda, M.M., Perri, S.H., Garcia, J.F. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. ***Theriogenology***. 2005; v. 63, p.1249–1255.

Cruz, F.B.; Junior, I.O.; Vieira, A.D.; Gerger, R.P.C.; Ribeiro, E.S.; Bertolini, M.; Mezzalira, A. Uterine re-flushing as a strategy to improve embryo recovery rate in dairy and beef cattle. ***Acta Scientiae Veterinariae***, V.36, N.3, P.249-254, 2008.

Ereno, R.L. **Dinâmica Folicular em Bovinos**. Dissertação (mestrado). BOTUCATU – SP, 17pg. 2002.

FONSECA, J.F. et al. Estádios de desenvolvimento embrionário de vacas zebuínas superovuladas. ***Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*** Belo Horizonte, v. 53, n. 6, p. 671-676, Dec. 2001.

Gonçalves, P.B.D.; Barreta, M.H.; Sandri, L.R.; Ferreira, R.; Antoniazzi, A.Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. ***Revista Brasileira de Reprodução Animal***. Belo Horizonte, v.31, n. 1, p.212-217, abr./jun. 2007. Disponível em <www.cbpa.org.br> Acesso em 20 de junho de 2015.

Jamil, H.; Samad H.A.; Qureshi, Z.I.; Rehman, N.; Lodhi, L.A. Effect of bull and sperm preparation method on *in vitro* fertilization of buffalo oocytes. ***Pakistan Veterinary Journal***. v. 27, n. 1, p. 29-34. 2007.

Leibfried, L.; First, N.L. Characterization of Bovine Follicular Oocytes and Their Ability to Mature *In Vitro*. ***Journal of Animal Science***, v. 48, p. 76-86, 1979.

Martins, C.F.; Siqueira, L.G.B.; Dode, M.A.N. Biotecnologia aplicada a pecuária bovina. In: **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. 1.ed. Brasília. cap. 20. p.654-708, 2011.

Monteiro, F.M. et al. Influence of Superovulatory Protocols on *In Vitro* Production of Nellore (*Bos indicus*) Embryos. **Reproduction in Domestic Animals**. v.45. p. 860-864, 2010.

Palma, G.A. Producción *in vitro* de embriones bovinos. In: _____. **Biotechnología de la reproducción**. 2. ed. Córdoba. Pugliese y Siena – Producción Gráfica Integral, p.313-375, 2008.

PRADO, F.R.A. **Protocolos de superovulação em vacas da raça Gir quanto ao número de estruturas totais, embriões viáveis e degenerados**. 2006. 51 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2006.

Sartori, R.; Barros, C.M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**. v 124 , Issue 3 , p. 244-250, Fev. 2011.

7. Relatório de Estágio

7.1. Introdução

O Estágio Obrigatório é uma disciplina realizada no último semestre do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV) da Universidade de Brasília (UnB). A disciplina pode ser realizada em qualquer local e área que o aluno desejar, desde que emita o certificado de cumprimento de 480 horas de estágio com o acompanhamento de alguém formado na área e capacitado à orientação.

O estágio curricular tem como objetivo possibilitar o desenvolvimento e aprofundamento de conhecimentos teóricos que o aluno adquiriu durante a graduação de forma prática e objetiva, e prepará-lo um pouco melhor para o mercado de trabalho no campo de atuação desejado.

A Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), criada em 26 de abril de 1973, é uma empresa de inovação tecnológica com o objetivo de gerar conhecimento e tecnologia para a agropecuária brasileira superar as barreiras que limitam a produção de alimentos, fibras e energia no nosso país. Atualmente a agropecuária brasileira já teve avanços significativos e é uma das mais eficientes e sustentáveis do planeta, o que tornou o país um dos maiores produtores e exportadores mundiais de alimentos.

O Centro de Transferência de Tecnologias de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira (CTZL), inaugurado em 2007, ocupa a área do antigo Sistema de Produção de Leite da Embrapa, de 194 hectares, localizada no Núcleo Rural Ponte Alta, no Gama (DF). A estrutura anterior foi reformada e hoje conta com prédio de administração, auditório, restaurante, alojamentos feminino e masculino, conjunto de prédios de apoio (guarita de acesso com segurança 24h, oficina, galpões, depósitos), fábrica de ração, sala de ordenha integrada, dois laboratórios, sala de informática, sala de controle de qualidade e um resfriador com capacidade para mil litros/dia.

O CTZL visa melhorar a qualidade do rebanho brasileiro de várias formas, entre elas, auxiliando produtores a melhorar geneticamente o gado zebuino leiteiro da região com a aplicação de biotécnicas reprodutivas, criar um selo de qualidade para identificar germoplasma zebuino trabalhado e fornecendo treinamento qualificado de mão-de-obra a agricultores, extensionistas e estudantes de graduação e pós-graduação.

7.2. Identificação do Estágio

Área de estágio: Biotecnologia de Reprodução Animal

Local: Centro de Transferência de Tecnologias em Raças Zebuínas Leiteiras e Laboratório de Reprodução Animal da Universidade de Brasília.

Orientador acadêmico: Prof. Dr. Ivo Pivato

Período de estágio: 16 de Março de 2015 a 10 de Abril de 2015 na UnB e 22 de Abril de 2015 a 30 de Junho de 2015 no CTZL.

Carga Horária: 40 horas semanais

7.3. Plano de Trabalho

Nome do Supervisor do estágio: Carlos Frederico Martins

Atividades a serem desenvolvidas:

Acompanhar as atividades de superovulação e transferência de embriões

Acompanhar as atividades de inseminação artificial

Coletar ovários no abatedouro

Acompanhar as atividades de aspiração folicular

Acompanhar as atividades de produção *in vitro* de embriões bovinos

Acompanhar as atividades de injeção intracitoplasmática de espermatozoides

Acompanhar as atividades relacionadas a transferência nuclear

Acompanhar o manejo reprodutivo do rebanho

Acompanhar a coleta e congelamento de sêmen de bovinos e felinos

Elaborar relatório de estágio simplificado

7.4. Atividades Desenvolvidas

A rotina acompanhada no período de estágio envolvia projetos de pesquisa com produção *in vitro* de embriões, transferência nuclear, coleta, avaliação e congelamento de sêmen bovino e felino, avaliação da dinâmica folicular de vacas, palpação retal e diagnóstico de gestação em vacas, manipulação hormonal em vacas, entre outras.

Quadro 1 – Atividades desenvolvidas durante o estágio obrigatório no CTZL.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	Nº
Lavagem e esterilização de materiais	*
Limpeza da estufa	2
Produção de pipetas para manipulação de ovócitos e embriões	2
Produção de meios	5
Ultrassonografia do sistema reprodutivo de vacas	80
Aspiração folicular de ovários de abatedouro	13
Aspiração folicular guiada por ultrassom	40
Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	4
Transferência de embriões	37
Coleta e congelamento de sêmen bovino	3
Coleta e congelamento de sêmen felino	3
Coleta de sangue de bovinos	3
Avaliação da dinâmica folicular de vacas	2x/semana
Palpação em vacas	40
Manipulação hormonal em vacas	20
Diagnóstico de gestação em vacas	40
Inseminação artificial	10
Exame andrológico	3
Acompanhamento da técnica de transferência nuclear	13

Acompanhamento da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)	1
Vermifugação de bovinos	100
Vacinação de bovinos	100
Descorna de bezerros	7
Castração de bezerros	10

*Realizada diariamente

7.4.1. Exame andrológico

Para que seja possível realizar a venda de touros ou de sêmen em leilões, é necessário que este possua o exame andrológico completo para a avaliação de sua capacidade reprodutiva. O exame andrológico completo consiste na anamnese, exame clínico geral e exame do sistema reprodutor.

O exame do sistema reprodutor deve ser feito detalhadamente, realizando a inspeção e palpação dos órgãos genitais externos, e a avaliação completa do sêmen (motilidade, vigor, concentração, morfologia).

7.4.2. Coleta de sêmen

Durante o estágio foi possível acompanhar coletas de sêmen em bovinos para avaliação da capacidade reprodutiva dos animais. A coleta do sêmen de felinos foi feita no zoológico para uma tese de doutorado.

7.4.2.1. Coleta de sêmen em bovinos

A coleta de sêmen em bovinos é mais eficiente quando feita por meio da vagina artificial, mas como é necessário fazer o condicionamento dos touros e ter uma área planejada para isso, foi utilizado o método da eletroejaculação, que também é considerado efetivo para a coleta.

O touro é contido no brete e o prepúcio é higienizado. O eletroejaculador é introduzido no reto do animal e direcionado para as glândulas anexas e os plexos neurais responsáveis pela ereção e ejaculação. Então é aplicada uma sequência de aproximadamente 30 estimulações até que ocorra a ejaculação. O sêmen é coletado com o auxílio de um funil encaixado em um tubo de centrífuga 15ml e rapidamente levado ao laboratório para análise qualitativa e quantitativa dos espermatozoides.

7.4.2.2. Coleta de sêmen em felinos

Os felinos selvagens são mais ariscos, por isso apenas a contenção manual não é apropriada para se fazer a coleta, sendo necessária a sedação dos animais.

Primeiramente é utilizada uma sonda para retirar a urina, e por meio dessa mesma sonda é injetada e retirada solução salina da bexiga até que o líquido retorne praticamente incolor, para impedir a contaminação do sêmen.

Só então é realizada a coleta, também por meio da eletroejaculação, e o sêmen é colhido com um tubo de micro centrífuga e levado diretamente ao laboratório para análise de qualidade e quantidade, assim como é feito com o sêmen bovino.

7.4.3. Congelamento de sêmen bovino e felino

O congelamento do sêmen é feito após a análise e o envasamento em palhetas de 0,5 ml ou 0,25 ml, com um congelador de sêmen, que faz uma curva de temperatura até atingir 5°C. Permanece nessa temperatura por quatro horas e depois começa uma nova curva que chega a -120°C. Ao atingir essa temperatura o sêmen deve ser colocado diretamente no nitrogênio líquido e colocado nas raques para ir ao botijão de nitrogênio.

7.4.4. Diagnóstico de gestação e ultrassonografia

O diagnóstico de gestação é feito por meio da palpação retal. Essa técnica permite confirmar ou não uma possível prenhez e determinar a fase gestacional em que o animal se encontra. O ultrassom pode ser utilizado como um coadjuvante ao processo, para a confirmação da prenhez em estágio inicial (até 30 dias), ou de algum

problema reprodutivo identificado na palpação. O exame ginecológico das vacas é feito concomitantemente a essa técnica.

7.4.5. Realização de protocolos hormonais

Os protocolos hormonais têm a finalidade de regulação e sincronização do ciclo estral do rebanho para realização de inseminação artificial, aspiração folicular guiada por ultrassom ou transferência de embrião em vacas receptoras.

A superovulação foi feita apenas uma vez durante o estágio para realização do projeto de pesquisa que visava comparar a qualidade de embriões coletados depois de 7 dias a inseminação artificial em vacas superovuladas e da produção de embriões *in vitro*, com os ovócitos coletados por meio da aspiração folicular guiada por ultrassom.

7.4.6. Inseminação Artificial por Tempo Fixo (IATF)

A Inseminação Artificial (IA) é o método de reprodução animal utilizado para depositar o sêmen no trato reprodutivo de uma fêmea em cio, com o objetivo de fecundá-la. Com o uso de hormônios em dias predeterminados, é possível sincronizar a ovulação das fêmeas e descartar a necessidade de observação do cio, que dificulta a implantação dessa técnica, já que precisa de mão de obra especializada, e em alguns casos o estro comportamental não se manifesta de forma que seja possível sua observação.

Essa técnica é uma das mais utilizadas no Brasil e no mundo, e existem diversos protocolos de IATF sendo aplicados atualmente. Dessa forma, é possível otimizar a mão-de-obra, reduzir o intervalo entre partos e, principalmente em gado de corte, padronizar lotes de bezerros.

7.4.7. Aspiração folicular

7.4.7.1. Aspiração folicular de ovócitos obtidos de ovários de abatedouro

A coleta dos ovários bovinos é realizada imediatamente após o abate da fêmea no abatedouro, com o auxílio de uma tesoura. Os ovários, então, são colocados em um vidro estéril com solução salina a 0,9% suplementada com antibióticos (penicilina e estreptomicina) a uma temperatura de 33-36°C.

No laboratório os ovários são colocados no banho maria já aquecido, e aspirados individualmente com uma agulha 40x12mm acoplada a uma seringa de 10ml. O líquido folicular é colocado em tubos de centrífuga 15ml que devem estar dentro do banho maria. É importante que todo o material tenha sido limpo com etanol 70%, os tubos de centrífuga 15ml tenham sido esterilizados, sejam usadas luvas e que o papel utilizado para secar os ovários tenha sido auto clavado.

Após a aspiração os ovócitos se sedimentam no fundo do tubo em 10 minutos e o pellet formado é retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e colocado em placas de Petri grandes com PBS, para que os ovócitos possam ser rastreados ao microscópio.

Depois de rastreados, esses ovócitos são colocados em outra placa com meio de lavagem e posteriormente classificados quanto a qualidade morfológica intracelular e quantidade e aparência das células do cumulus, que é dividida em graus de 1 a 4. Como serão usados para clonagem, são separados em uma placa apenas os ovócitos de grau 1 e 2, que tem melhor qualidade, e colocados em meio de maturação comercial até o dia seguinte.

7.4.7.2. Aspiração folicular de ovócitos *in vivo*

Para a realização da aspiração folicular, os animais são contidos em troncos. É feita anestesia epidural baixa com lidocaína 2%, com dosagem dependente do peso do animal, após ter sido feita assepsia do local com álcool 70%. A cauda é presa e a vulva lavada com água e esterilizada com álcool 70%.

O equipamento de aspiração é introduzido pela vagina e posicionada no fórnix vaginal em direção ao ovário a ser aspirado. Os ovócitos são aspirados em meio de lavagem produzido no laboratório de reprodução animal do CTZL em temperatura de 36 a 37°C, com uma pressão de 80 a 110mmHg, e então levados ao laboratório para filtragem, rastreamento, classificação e para o processo de produção *in vitro* de embriões.

7.4.8. Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotécnica de reprodução assistida utilizada para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir o descarte precoce de fêmeas portadoras de alterações adquiridas que as impeçam de reproduzir pela forma natural ou via transferência de embriões (TE).

A produção *in vitro* de embriões compreende três etapas desenvolvidas em laboratório: a maturação ovocitária *in vitro* (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo embrionário *in vitro* (CIV) até os estádios de mórula e blastocisto, quando os embriões poderão ser transferidos ou criopreservados.

7.4.8.1. Maturação *in vitro*

Para que os ovócitos se tornem aptos a fecundação é necessário que passem pelo processo de maturação, onde passam por várias transformações celulares e moleculares para que os ovócitos adquiram a capacidade de fecundação. O processo de maturação se inicia com a retomada da meiose, por decorrência da quebra da vesícula germinativa.

Os ovócitos são colocados em gotas de meio de lavagem e posteriormente transferidos para gotas de meio MIV cobertas com óleo mineral. Cada gota pode ter de 25 a 30 ovócitos, separadas por vacas no caso da maturação de ovócitos para fecundação, e separadas por qualidade no caso de maturação para clonagem ou ICSI. A maturação *in vitro* dura de 22 a 24h em estufa a 38,5°C e 5% de CO₂.

7.4.8.2. Fecundação *in vitro*

Para que a fecundação *in vitro* seja possível é necessário realizar a capacitação do espermatozoide, que é feito após o descongelamento do sêmen. O sêmen, após avaliação de capacidade espermática, é colocado sobre a coluna de Percoll a 45% e 90% e levado a centrífuga a 6000rpm por cinco minutos. O pellet formado é retirado e resuspendido em 1 ml de meio CAP (meio de capacitação comercial), para neutralizar a ação tóxica do Percoll e levado novamente a centrífuga a 6000rpm por cinco minutos. Então, o pellet de espermatozoides é retirado e colocado no meio de fecundação.

Após uma segunda análise dos espermatozoides e da contagem na câmara de Neubauer, é feita a concentração espermática e colocados junto aos ovócitos, que já se encontram no meio de fecundação depois de terem sido lavados, e são colocados novamente na estufa por 12 a 18h.

7.4.8.3. Cultivo *in vitro*

Após a fecundação, os zigotos são retirados do meio FIV e lavados em duas gotas de meio SOF (synthetic oviduct fluid), para transferi-los para a gota de cultivo embrionário, que não pode ter a presença de espermatozoides. No CIV os zigotos são avaliados quanto a clivagem dois dias após e são mantidos em cultivo por 6 dias.

A taxa de formação de blastocisto pode ser avaliada a partir do D6 e a transferência ocorre no D8.

7.4.8.4. Finalização do processo de PIV

No D8, os embriões são envasados um por um em palhetas 0,25mm com uma seringa de insulina adaptada. Deve-se ter colunas intercaladas de meio e ar, sendo que o embrião deve ser colocado na coluna central com o meio.

Com o embrião pronto para a transferência, é mantido a 37,5°C no transportador. No momento em que a receptora já está preparada, o inovulador é montado e pode ser feita a transferência.

Todos os materiais utilizados são lavados e esterilizados, o inovulador é limpo com álcool 70% depois da inovulação de cada embrião, para que não haja contaminação, e sempre é utilizada a camisinha sanitária.

7.4.10. Transferência de embriões

A transferência de embriões pode ser feita com embriões produzidos *in vitro* ou *in vivo*, com a finalidade de aumentar o rebanho, com animais geneticamente superiores e em um tempo significativamente menor.

Inicialmente deve ser realizada a ultrassonografia nas receptoras para observar os ovários e confirmar a presença do corpo lúteo, para ter certeza de que ela está apta a receber o embrião. Com a confirmação de aptidão da vaca, é realizada a

anestesia peridural com lidocaína 2% e dosagem de acordo com seu peso. É realizada a higienização da região perineal com água e sabão neutro, e depois desinfetada com álcool 70%

Com o auxílio de um inovulador, o embrião é depositado no corno uterino, necessariamente o mesmo em que se encontra o corpo lúteo.

7.4.11. Transferência Nuclear

A transferência nuclear, mais conhecida como clonagem tem o objetivo de produzir animais geneticamente idênticos, para preservar um animal que seja destaque. Também existe interesse na propagação de indivíduos transgênicos, na preservação de espécies ameaçadas de extinção e também na biomedicina, para a produção de tecidos e órgãos. No laboratório a clonagem é feita semanalmente, duas vezes por semana, para um trabalho de doutorado.

São utilizados ovócitos de abatedouro maturados, que são micromanipulados para retirar os corpúsculos polares (núcleos) e colocar células somáticas do tecido adiposo ou do fluído amniótico do animal que deseja obter o clone. As células somáticas devem estar em confluência para a realização do procedimento, pois se encontram no G0 do ciclo celular.

Após a micromanipulação é feita a eletrofusão para que as membranas celulares se unam e o núcleo da célula somática entre em contato com o citoplasma ovocitário. Além disso, com a eletrofusão é liberado cálcio intracelular, que dá início ao processo de ativação. A ativação química, feita com a ionomicina e o 6-Deimethylamino-purine (6-DMAP), imita o que ocorre com a célula quando o espermatozoide entra em contato com o ovócito, e regula o influxo de cálcio nas células fusionadas.

Depois que é feita a ativação, a célula formada é colocada em cultivo de acordo com os mesmos métodos utilizados na produção *in vitro* dos animais.

7.4.12. Outros

Além de todas essas atividades, foi possível acompanhar a rotina de campo e ordenha. Aprender sobre o manejo do gado, vermifugação, vacinação, aplicação de medicamentos, curativos, cuidados neonatais, castração e descorna de bezerros, coleta de sangue, entre outros.

No laboratório, era necessário fazer a limpeza e esterilização de matérias, e foi possível acompanhar todos os procedimentos, inclusive a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

7.5. Considerações finais

O período de estágio no CTZL, foi de grande valia, pois tive a oportunidade de aprender mais sobre as biotecnologias aplicáveis à área de reprodução animal. Foi importante, também, para minha familiarização com a rotina laboratorial e de campo. Acompanhei vários projetos de pesquisa que possibilitaram uma melhor fixação da teoria adquirida em sala de aula. O estágio também agregou muito conhecimento científico através do estudo e dos mestrados, doutorandos, pesquisadores e funcionários, que se apresentaram sempre disponíveis a explicar quaisquer dúvidas.