

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS PALOTINA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO
ATIVIDADES DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO
ÁREA: REPRODUÇÃO EM BOVINOS

Aluno: Renan Souza Barros
Orientador: M. V. Alfredo de Souza Castro Netto
Supervisor: Professor Roberto Rochadelli

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como parte das exigências para a conclusão do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná.

PALOTINA - PR
Dezembro de 2014

FOLHA DE APROVAÇÃO

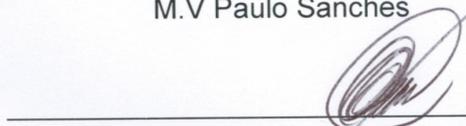
Universidade Federal do Paraná
Setor Palotina
Curso de Medicina Veterinária

Relatório Final de Estágio Supervisionado
Área de Estágio: Reprodução em Bovinos
Acadêmico: Renan Souza Barros
Orientador de Estágio: Alfredo de Souza Castro Netto
Supervisor de Estágio: Prof Roberto Rochadelli

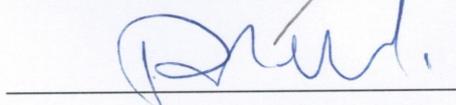
O PRESENTE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO FOI
APRESENTADO E APROVADO PELA SEGUINTE BANCA
EXAMINADORA:



M.V Paulo Sanches



Prof. Arlei José Birck



Prof. Supervisor Roberto Rochadelli

Palotina, Novembro de 2014

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus, pois ele foi quem me deu forças nos momentos difíceis, vividos nesses 5 anos de faculdade, momentos em que tivemos vontade de desistir de tudo e abandonar esse sonho. Desejo sempre que o Senhor continue iluminando meu caminho, para que possa conquistar tudo que busco. Obrigado Senhor, por me ajudar a conquistar esse sonho, ser Médico Veterinário.

Em seguida, se faz necessário agradecer aos meus pais, Amilton e Terezinha, pois sem eles eu nem estaria neste mundo. Eles são, e sempre serão, a base de tudo em minha vida. Foram eles que proporcionaram mais essa conquista, me sustentando com o suor de seus trabalhos, para que pudesse estar em Palotina estudando. Meus pais me deram sabedoria e humildade, além de força para lutar por esse sonho. Meu eterno obrigado, amo vocês.

Gostaria também de agradecer aos meus irmãos, Guilherme e Rafael, que me incentivaram e apoiaram todos esses anos de minha vida, além do companheirismo e ajuda naquelas decisões que as vezes são difíceis de serem tomadas. Um agradecimento extra ao meu irmão Rafael, que, juntamente com sua esposa, nos presenteou este ano com a chegada do meu sobrinho Pedro, que enche de alegria nossos dias.

Minha família foi, e é, muito importante em toda minha trajetória. Agradeço aos meus tios e tias, minhas cunhadas (Gabriela e Aniella), meus primos, enfim, a todos aqueles que, de maneira direta ou indireta, interferiram nessa minha formação. Obrigado a todos.

Um abraço aos meus amigos de Santa Cruz do Rio Pardo, em especial aos mais presentes como: Lucas, Bagode, João Paulo, Caio, Matheus, Luiz Henrique, entre outros. E como não falar dos amigos conquistados em Palotina, os quais levarei pra vida toda e junto aos quais passei muitos bons momentos. São eles: Dalton (Daltinho), Andrei (Buçal), Vagner (Farinha), Alan (Indio), Conrado (Bardoso), Luiz Alfredo (Butina), Rafael (Vermeio), Gefferson, Giovane, Guilherme (Tião), Edvaldo (Bola), Eduardo (Bugarão), Paulo Sanches (Cueio), Paulo Miguel (Paulão), João Paulo (Butiá), Matheus (Zago), Tainã, Renan (Sardinha), Isaac, Michel, Erica

(Kita), Andressa, Raquel, Fernanda, entre muitos outros. Meus sinceros agradecimentos pela companhia estes 5 anos.

À UFPR *Campus* Palotina, por ter sido minha escola de veterinária. À todos os professores e colaboradores que foram muito importantes e não mediram esforços para proporcionar uma boa formação profissional.

Quero agradecer também ao meu professor Supervisor Roberto Rochadelli, que me acompanhou desde o começo da faculdade e sempre me ajudou em tudo que necessitei. Além do que, está sempre disposto a fazer com que seus alunos saiam vitoriosos desta faculdade. Meu eterno agradecimento “Rocha”, o senhor é um exemplo de pessoa. Obrigado.

E, por fim, gostaria de agradecer a empresa Sexing Technologies e toda equipe de trabalho, que me acolheu durante este período de estágio. Lá, pude aprender muitas coisas que, certamente, influenciarão minha carreira profissional, além de que, a experiência de morar fora do Brasil por alguns meses não tem preço, é algo muito “enriquecedor”. Não posso finalizar sem citar os amigos que fiz quando estive nos EUA, os quais guardarei com carinho na memória e pretendo revê-los em breve. São eles: Fabio e Ana (vocês são duas pessoas muito especiais que me ajudaram em muito, nas duas vezes que estive presente na empresa, obrigado pelo carinho), Dr. Meliton, Rodrigo, Dr Alfredo, Paula, Ulisses, Tony, Deyvis, Dr Roldan, Daniela, Alejandro, Selma, Lee, Jorge, Gabriele, Eduardo. Obrigado!!

Minhas desculpas, se esqueci de algum amigo durante meus agradecimentos. Minha vontade foi listar todos os nomes que se fizeram presentes nesses 5 anos de faculdade em Palotina. Grande abraço a todos e muito obrigado!

FOLHA DE IDENTIFICAÇÃO

LOCAL DO ESTÁGIO: Empresa Sexing Technologies

College Station, Texas, Estados Unidos da América.

Carga horária cumprida: 600 horas.

Período de realização de estágio: 04/08/2014 a 18/11/2014.

Orientador: M. V. Alfredo de Souza Castro Netto.

Supervisor: Prof. Roberto Rochadelli.

Dedico este relatório aos meus pais Amilton e Terezinha, que foram e certamente continuarão sendo os maiores incentivadores em minha vida. Amo vocês.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Vista da entrada da central, onde foi realizado o estágio obrigatório no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.....	5
GRÁFICO 1 - Número total de procedimentos acompanhados no estágio curricular obrigatório realizado na empresa Sexing Technologies, de 04/08/2014 a 18/11/2014.....	7
FIGURA 2 - Vista panorâmica do curral, onde era realizadas as atividades dentro do estágio obrigatório, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.....	6
FIGURA 3 - Remoção de folículos dominantes, realizada na empresa Sexing Technologies durante o estágio obrigatório, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.....	15
FIGURA 4 - Protocolo para sincronização de fêmeas para aspiração folicular, utilizado na empresa Sexing Technologies durante o estágio obrigatório, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.....	16
FIGURA 5 - Implante de progesterona (CIDR - Pfizer) e benzoato de estradiol, utilizados para sincronização de receptoras realizado na empresa Sexing Technologies durante estágio obrigatório, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.....	18
FIGURA 6 - Protocolo de superovulação utilizado em doadoras de embrião, durante o estágio obrigatório realizado na empresa Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.....	20
FIGURA 7 - Ilustração de estruturas envolvidas no procedimento de coleta de embriões, durante o estágio obrigatório realizado na empresa Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.....	22

FIGURA 8 - Ilustração da classificação de embriões segundo a IETS (International Embryo Transfer Society), usada durante o estágio obrigatório realizado na empresa Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.....	23
FIGURA 9 - Ilustração da classificação de embriões segundo a IETS (International Embryo Transfer Society), usada durante o estágio obrigatório realizado na empresa Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.....	24
FIGURA 10 - Ilustração do modo de envase do embrião na palheta, usado durante o estágio obrigatório realizado na empresa Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.....	25
FIGURA 11 - Ilustração dos inovuladores de embrião já montados, durante o estágio obrigatório na empresa Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.....	27
FIGURA 12 - Ilustração da aspiração folicular, realizada durante o estágio obrigatório na empresa Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.....	28

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Número total e percentagem de procedimentos clínicos acompanhados durante o estágio curricular obrigatório realizado na Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014..... 8
- TABELA 2.** Número total e percentagem de procedimentos cirúrgicos acompanhados durante o estágio curricular obrigatório realizado na Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014..... 9
- TABELA 3.** Número total e percentagem de outros procedimentos acompanhados durante o estágio curricular obrigatório realizado na Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014..... 9
- TABELA 4.** Número total e percentagem de procedimentos reprodutivos acompanhados durante o estágio curricular obrigatório realizado na Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014..... 10

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CL - Corpo Lúteo

DFR - Dominant follicle removal

FIV - Fertilização *in vitro*

IATF - Inseminação Artificial em Tempo Fixo

PIV - Produção *in vitro*

PIVE - Produção *in vitro* de embriões

SO - *Superovulação*

ST - Sexing Technologies

TE - Transferência de embrião

US - Ultrassonografia

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	1
2. INTRODUÇÃO.....	2
3. DESCRIÇÃO GERAL DO LOCAL DE ESTÁGIO.....	3
4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE ESTÁGIO.....	7
4.1. AVALIAÇÃO GINECOLÓGICA POR PALPAÇÃO RETAL.....	11
4.2. AVALIAÇÃO GINECOLÓGICA POR PALPAÇÃO RETAL COM ULTRASSONOGRRAFIA.....	12
4.3. DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO POR PALPAÇÃO RETAL.....	12
4.4. DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO POR ULTRASSONOGRRAFIA.....	13
4.5. SEXAGEM FETAL COM ULTRASSONOGRRAFIA.....	14
4.6. REMOÇÃO DE FOLÍCULOS DOMINANTES (DFR).....	15
4.7. SINCRONIZAÇÃO DE FÊMEAS PARA ASPIRAÇÃO FOLICULAR.....	16
4.8. SINCRONIZAÇÃO DE RECEPTORAS DE EMBRIÃO.....	17
4.9. SUPEROVULAÇÃO DE FÊMEAS PARA COLETA DE EMBRIÃO.....	18
4.10. COLETA DE EMBRIÃO.....	21
4.11. CONGELAÇÃO DE EMBRIÃO.....	25
4.12. INOVULAÇÃO DE EMBRIÕES.....	26
4.13. PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIV).....	27
4.13.1. <i>RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS</i>	28
4.13.2. <i>CLASSIFICAÇÃO DE OÓCITOS</i>	29
4.13.3. <i>MATURAÇÃO DE OÓCITOS</i>	29
4.13.4. <i>FERTILIZAÇÃO IN VITRO (FIV)</i>	30
4.13.5. <i>CULTIVO IV VITRO DE EMBRIÕES</i>	30
4.13.6. <i>VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES</i>	31
5. CONCLUSÃO.....	32
6. SUGESTÕES.....	33
REFERÊNCIAS.....	34

1.RESUMO

No presente Trabalho de Conclusão de Curso, são apresentadas as atividades técnicas desenvolvidas no período de 04 de agosto a 21 de novembro de 2014, na empresa Sexing Technologies, dentro da disciplina de Estágio Supervisionado Obrigatório do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná. As atividades foram orientadas pelo Médico Veterinário Alfredo de Souza Castro Netto. São contempladas neste trabalho as atividades realizadas dentro da fazenda da empresa, sendo que, as mesmas se relacionam com as matérias de Biotecnologia da Reprodução e Fisiopatologia da Reprodução, ambas cursadas durante o curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná no Setor Palotina. É relatada a estrutura e o funcionamento da empresa no quesito da reprodução, bem como os procedimentos realizados durante o estágio. Estão descritos os procedimentos que ocorreram com maior frequência.

PALAVRAS - CHAVE: Bovinos, Reprodução, Embrião.

2. INTRODUÇÃO

A oferta suficiente de alimentos saudáveis, a prevenção e controle de enfermidades e a sobrevivência harmoniosa do homem nos diferentes ecossistemas é sem dúvida o maior desafio da ciência na atualidade. O investimento na biotecnologia de ponta em produção animal no Brasil é respaldado por dois principais fatos. O primeiro, é o fato que o Brasil ainda lidera a lista dos países com maior biodiversidade e o segundo, é que o mercado interno por carne e leite é o terceiro maior mercado potencial do mundo (EMBRAPA, 2011).

A reprodução animal, principalmente as biotécnicas aplicadas à mesma, são as principais ferramentas para maximizar a produção de carne e leite, sem que necessite um aumento das áreas territoriais destinadas à bovinocultura.

No atual contexto de evolução da produtividade na pecuária nacional, associado às evoluções científicas e tecnológicas, várias biotecnologias ligadas a reprodução animal vem sendo desenvolvidas e aprimoradas, com o intuito de aumentar a eficiência reprodutiva, maximizando a produção de animais geneticamente superiores, visando o aproveitamento deste material genético para obtenção do maior número de descendentes, em um curto período de tempo (RENESTO e COELHO, 2004).

A utilização e o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução animal são condições indispensáveis para o aumento da eficiência produtiva. Nesse sentido, especialmente no que se refere aos ruminantes domésticos, biotécnicas como a inseminação artificial, fertilização *in vitro* e a transferência de embriões vêm sendo utilizadas com sucesso (FIGUEIREDO et al., 2007).

Os avanços obtidos nas biotécnicas reprodutivas ao longo dos anos permitiram maior participação da fêmea bovina no processo de melhoramento genético do rebanho, visto que o número de descendentes deixados por uma única fêmea ao longo de sua vida reprodutiva aumentou significativamente com o aperfeiçoamento das técnicas de transferência e produção *in vitro* de embriões (GONÇALVES et al., 2007).

O grande benefício dessas biotecnologias, de produção de embriões *in vivo* e *in vitro*, é poder utilizar embriões de vacas de alto valor genético em receptoras comuns com o objetivo de acelerar o processo de melhoramento, gerando aumento de produtividade e lucratividade para toda a cadeia de produção de carne e de leite.

O Brasil é o maior produtor de embriões bovinos do mundo, respondendo por quase um terço da produção.. A mudança ocorrida no mercado nacional após 2004 com a progressiva substituição da chamada transferência de embriões convencional (ou simplesmente TE) pela produção de embriões em laboratório (conhecida como FIV ou PIV), fez com que a participação do Brasil no total de embriões produzidos por superovulação fosse reduzida pela metade no período 2004-2007. Com isso, o país ficou atrás, no cenário mundial, do eixo EUA-Canadá e Japão. No mercado de embriões PIV, no entanto, o país consolidou sua liderança, respondendo por mais de 85% do total mundial (SBTE, 2009).

O desenvolvimento da pecuária nacional está associado às biotécnicas utilizadas. O Brasil é detentor de um bom nível técnico-científico das biotécnicas aplicadas à reprodução animal e tem se destacado como um dos maiores produtores de embriões in vitro, não só pelo domínio da técnica, mas pela qualidade do nosso rebanho, principalmente no tocante a gado de corte.

O estágio foi realizado na empresa Sexing Technologies, em Navasota, Texas - EUA, durante o período de 04 de Agosto a 19 de Novembro, sob orientação do Médico Veterinário Alfredo de Souza Castro Netto, totalizando 720 horas.

Neste relatório, estão descritas as atividades realizadas e acompanhadas nessas 13 semanas de estágio, distribuídas também em forma de tabela e imagens. São relatados com maior acurácia as atividades mais relevantes.

3. DESCRIÇÃO GERAL DO LOCAL DE ESTÁGIO

Na década de 1980, um avanço na tecnologia de sexagem de sêmen foi obtido por pesquisadores do USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) em Livermore, Califórnia, EUA, criando-se as patentes para esta tecnologia. Já em 1990, consideráveis pesquisas foram feitas para otimizar a eficiência desses procedimentos de classificação de sêmen. A comercialização de sêmen sexado nos Estados Unidos, propriamente dita, foi iniciada com uma licença em 2003, a qual foi concedida a empresa Sexing Technologies, marco que deu início aos trabalhos da mesma, bem como a produção de embriões usando este sêmen sexado. A Sexing Technologies foi criada com o objetivo de produzir sêmen sexado em todo o mundo, e foi em 2004 que inaugurou o primeiro laboratório, com suas operações em

Navasota, Texas. Após este laboratório criado no Texas, o negócio começou a crescer e, atualmente existem laboratórios em diversas partes do mundo, sendo que, alguns são responsáveis pela produção de sêmen sexado e/ou embriões. Segue, abaixo, a lista de laboratórios pertencentes à empresa e alguns onde há parceria da Sexing Technologies com outras empresas de sêmen convencional:

- 2004 - Sexing Technologies - Navasota, Texas - USA
- 2005 - Lagoa - Holland Genetics - Sertãozinho - Brazil
- 2006 - Select Sires - Marysville, Ohio - USA
- 2006 - ABS - De Forest, Wisconsin - USA
- 2007 - Holland Genetics - Deventer - Netherlands
- 2007 - CRI - Genex - Ithaca, New York - USA
- 2007 - Alta Genetics - Conrich, Alberta - Canada
- 2008 - ST TWG (Trans World Genetics) - Fond Du Lac, Wisconsin - USA
- 2008 - Accelerated Genetics - Westby, Wisconsin - USA
- 2009 - CRI-Genex - Shawano, Wisconsin - USA
- 2009 - Umotest - Roulans - France
- 2009 - Semen Italy - Bibbiano - Italy
- 2009 - Sexing Technologies - Hamilton - New Zealand
- 2010 - Sexing Technologies - Fullerton, Nebraska - USA
- 2010 - Sexing Technologies - South Charleston, Ohio - USA
- 2011 - Sexing Technologies - Camperdown, Victoria - Australia
- 2011 - Sexing Technologies - Laceyville, Pennsylvania - USA
- 2011 - Sexing Technologies - Lincoln University, Pennsylvania - USA

A empresa obteve sucesso com essa tecnologia de sexagem de sêmen e hoje é líder de mercado neste ramo, sendo responsável por mais de 90 por cento da produção mundial de sêmen sexado, além de ser parceira das maiores empresas de sêmen convencional do mundo.

Este estágio foi realizado na central da empresa, a qual está localizada no endereço 22575 Highway 6 South Navasota, Texas, EUA. Essa central tem uma área de aproximadamente 500 alqueires, divididos em piquetes, onde estão alojadas aproximadamente 1600 cabeças de gado, fêmeas, das mais diversas raças (Brahman, Wagyu, Holandês, Girolando, Aberdeen Angus, Red Angus, Longhorn,

Brangus, Guzerá, Santa Cruz, Brambi, Senepol, entre outras), as quais tem o propósito de servirem como receptoras ou doadoras de embrião e/ou oócitos para FIV. Além desta quantidade de fêmeas, existem aproximadamente 190 touros alojados em galpões climatizados, os quais fornecem sêmen para sexagem e comercialização de doses, bem como produção de embriões dentro da central (FIGURA 1).



FIGURA 1 - Vista da entrada da central, onde foi realizado o estágio obrigatório no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.

Existem “grupos” (setores) de trabalhos dentro da empresa, sendo eles: pessoal responsável pelos laboratórios de sexagem de sêmen e produção de embriões, pessoal responsável por toda rotina executada com os touros (manejo, trato, coleta de sêmen, etc), e o pessoal responsável pela rotina das fêmeas (manejo, alimentação, sanidade, protocolos para coleta de embrião, entre outros diversos serviços).

Foi escolhida a área de reprodução que envolvia as fêmeas, fui enquadrado no terceiro grupo, e o horário de atendimento desta “sessão” era de segunda a sexta-feira, das 08h as 17h (sendo que os dias em que havia mais trabalho, iniciava-se as 06h30min). Aos finais de semana, havia um rodízio entre os membros deste “grupo”, onde cada um ficava responsável por um final de semana.

Dentre os serviços veterinários prestados nesta “área”, incluem-se principalmente diagnóstico de gestação e avaliação ginecológica por palpação retal e ultrassonografia em receptoras e doadoras, sexagem, coleta, transferência (TE) e congelamento de embriões, aspiração folicular para produção de embriões in vitro (FIV), e, esporadicamente, algumas intervenções clínicas como tratamentos para mastite, problemas de casco, partos, entre outros.

A Sexing Technologies conta com uma vasta carta de clientes que tem interesse em melhorar seus plantéis. Portanto, optam por utilizar as biotecnologias que a empresa oferece, as quais proporcionam um melhoramento genético muito interessante para estes clientes. Os mesmos, geralmente trazem suas melhores matrizes para que sejam “aspiradas” (para FIV) ou coletadas (coleta de embrião convencional), onde tais embriões produzidos ou coletados, sejam inovulados (transferidos) em receptoras sincronizadas que estão presentes nesta fazenda da empresa. Após a confirmação de prenhez aos 30 dias, 60 dias (se faz a sexagem destes fetos) e aos 120 dias, estas receptoras voltam as propriedades desses clientes para que possam parir. Todos os procedimentos eram realizados em troncos (“shuts”) pneumáticos, localizados em um grande curral (FIGURA 2).



FIGURA 2 - Vista panorâmica do curral, onde eram realizadas as atividades dentro do estágio obrigatório, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.

O compromisso da Sexing Technologies com seus clientes, é de fornecer sêmen com garantia de qualidade (destinados a gado de corte e leite), além de atuar de maneira altamente tecnicada e moderna com as biotecnologias da reprodução, que proporcionam aos clientes um ganho genético muito grande.

As atividades consistiram no acompanhamento dos Médicos Veterinários Alfredo de Souza Castro Netto, Nestor Diaz, Victor e Fred, em atividades que englobavam as doadoras e as receptoras de embriões, nas áreas de fisiopatologia da reprodução e biotecnologias da reprodução de fêmeas bovinas na central da empresa, em Navasota, Texas.

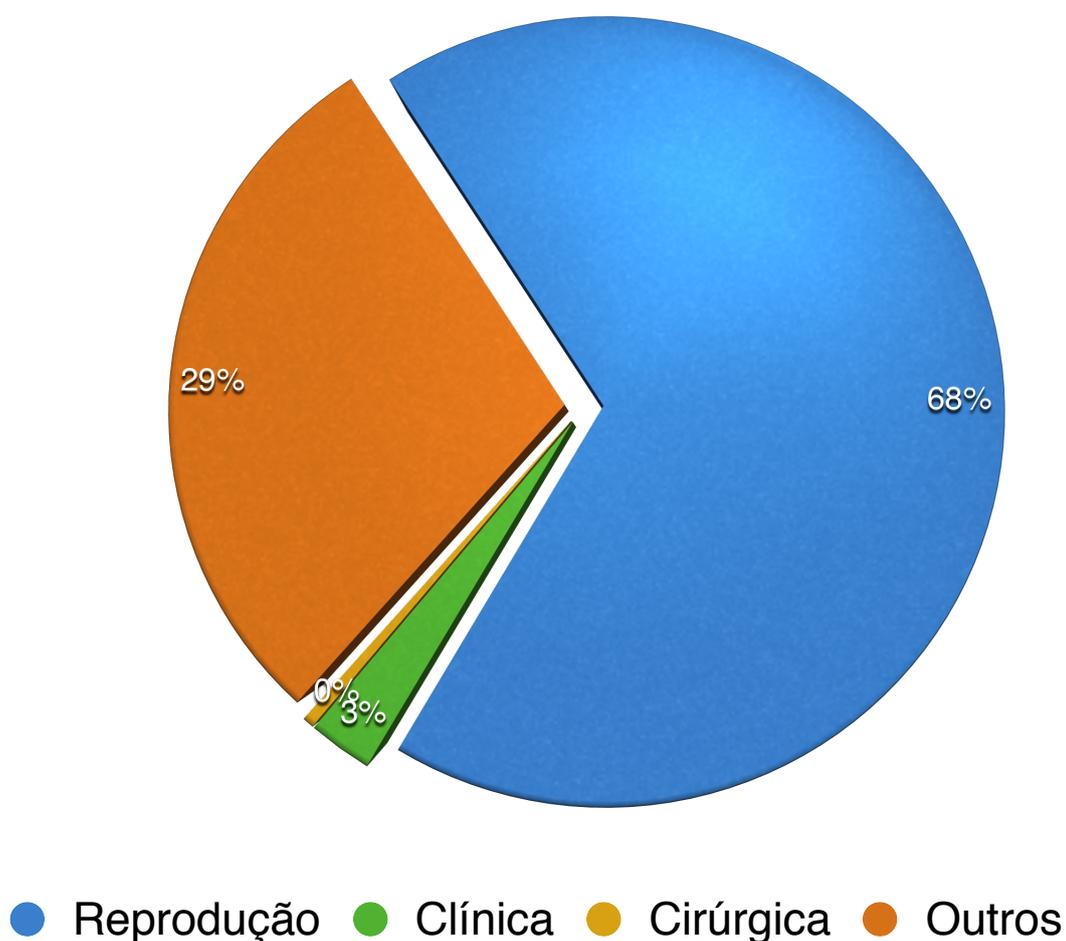
4. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO

O estágio foi realizado na empresa Sexing Technologies, no período de 04 de Agosto a 18 de Novembro de 2014 sob orientação do Médico Veterinário Alfredo de Souza Castro Netto, totalizando 720 horas.

Realizavam-se procedimentos reprodutivos, sendo que as vezes haviam intervenções clínicas e/ou cirúrgicas. No gráfico 1 é apresentado a proporcionalidade dos procedimentos acompanhados durante o estágio.

GRÁFICO 1 - Procedimentos acompanhados no estágio curricular obrigatório realizados na empresa Sexing Technologies, de 04/08/2014 a 18/11/2014.

PROCEDIMENTOS



Ao todo, foram realizados 290 procedimentos clínicos (Tabela 1), 52 cirúrgicos (Tabela 2), 3201 outros (Tabela 3), e 7549 reprodutivos (Tabela 4) perfazendo um total de 10975 procedimentos durante o período de estágio.

A seguir são descritos os procedimentos clínicos, divididos de acordo com cada sistema.

TABELA 1. Procedimentos clínicos acompanhados durante o estágio curricular obrigatório realizado na Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.

SISTEMA	CASO CLÍNICO	TOTAL	FREQUÊNCIA (%)
Digestório	Diarréia	2	0,68%
Reprodutivo	Aborto	22	7,58%
	Cisto Ovariano	126	43,44%
	Distocia	1	0,34%
	Infecções uterinas	7	2,41%
	Prolapso de Vagina	2	0,68%
	Retenção de Membranas Fetais	2	0,68%
	Mumificação Fetal	1	0,34%
Mamário	Mastite Aguda	2	0,68%
Muscular ou Locomotor	Úlcera de sola	3	1,03%
	Dermatite Interdigital	21	7,24%
	Contusão por trauma	1	0,34%
	Casqueamento Corretivo	15	5,17%
Tegumentar	Papilomatose	2	0,68%
Oftálmico	Ceratoconjuntivite	83	28,62%
TOTAL		290	100%

A seguir são descritos os procedimentos cirúrgicos, divididos de acordo com cada sistema.

TABELA 2. Procedimentos cirúrgicos acompanhados durante o estágio curricular obrigatório realizado na Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.

SISTEMA	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	TOTAL	FREQUÊNCIA (%)
TEGUMENTAR	Descorna	50	96,15%
REPRODUTIVO	Inovulação de embriões por Laparotomia	1	1,92%
	Remoção de tumor na vulva	1	1,92%
TOTAL		52	100%

A seguir são descritos procedimentos diversos, como a imunização do rebanho, através da vacinação.

TABELA 3. Outros procedimentos acompanhados durante o estágio curricular obrigatório realizado na Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.

ÁREA	ATIVIDADE	TOTAL	FREQUÊNCIA (%)
OUTROS	Necrópsia	1	0,03%
	Vermifugação	1600	49,48%
	Vacinação	1600	49,48%
TOTAL		3201	100%

A seguir são descritos os procedimentos reprodutivos, os quais foram ênfase do estágio realizado.

TABELA 4. Procedimentos reprodutivos acompanhados durante o estágio curricular obrigatório realizado na Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.

ÁREA	PROCEDIMENTO	TOTAL	FREQUÊNCIA (%)
REPRODUÇÃO	Diagnóstico de Gestação com US	1820	24,10%
	Diagnóstico de Gestação por palpação	400	5,29%
	Sexagem com ultrassonografia	210	2,78%
	Inovulação de embrião	2000	26,49%
	Coleta de embrião	45	0,59%
	Aspiração folicular	780	10,33%
	Protocolos para sincronização de receptoras e doadoras	1330	17,61%
	Congelação de embrião	47	0,62%
	Avaliação por palpação e US de receptoras	600	7,94%
	Avaliação por palpação e US de doadoras	200	2,64%
	DFR	117	1,54%
TOTAL		7549	100%

4.1 AVALIAÇÃO GINECOLÓGICA POR PALPAÇÃO RETAL

Segundo Grunert et al. (2005), a sequência do exame ginecológico por palpação retal é a seguinte: procurar a cérvix com o encontro da bifurcação da prega intercornual, tracionando o conjunto para cavidade pélvica; palpação dos dois cornos uterinos; procura e palpação quando possível dos ovidutos; palpação dos ovários, evidenciação e avaliação das formações, que caracterizam suas funções (folículos e corpo lúteo), bem como possíveis alterações patológicas (cistos); palpação de formações anatômicas anexas aos órgãos genitais (ligamentos artérias e veias), das regiões circunvizinhas, formações da cavidade pélvica, formações ósseas da pelve e vasos sanguíneos e linfáticos, bem como linfonodos.

Para melhores resultados na taxa de prenhez deve-se selecionar somente as receptoras com uma boa condição corporal, que não apresentam nenhum tipo de patologia reprodutiva e que estão ciclando regularmente para depois iniciar o protocolo hormonal de sincronização. Com a palpação retal avaliamos a consistência e tamanho do útero, os ovários, e se a morfologia da cérvix permitirá a passagem do inovulador de embriões.

Foram realizadas 200 avaliações ginecológicas por palpação retal sem uso de ultrassom, com a finalidade de identificar novilhas que serviriam de receptoras, deixando de lado as que tivessem útero subdesenvolvido, ovário hipoplásico, agenesia de ovário e útero, má formações, tumores e cistos. Foram diagnosticados cistos em alguns ovários e úteros infantis em algumas novilhas.

Além disso, realizou -se avaliação das estruturas funcionais do ovário, como corpo lúteo e folículos, para identificar novilhas que estariam realmente ciclando, com finalidade de formar um lote uniforme, onde seriam sincronizadas com hormônios para posteriormente receberem embriões em tempo fixo.

4.2 AVALIAÇÃO GINECOLÓGICA POR PALPAÇÃO RETAL COM ULTRASSONOGRRAFIA

Exames ultrassonográficos do trato reprodutivo são de grande importância para determinar se um animal está apto para reprodução, qual a fase do ciclo estral ou se apresenta alguma desordem do trato reprodutivo (GRIFFIN e GINTHER, 2002).

Para as fêmeas doadoras de embriões ou fêmeas que seriam submetidas à aspiração folicular, essas sim passavam por uma avaliação ginecológica com o uso de ultra-sonografia, onde eram analisadas as imagens fornecidas pelo ultra-som quando a probe do mesmo era colocada sobre os ovários e útero (as imagens do ultra-som fornecem com clareza se há ou não presença de líquidos no útero, ou cistos nos ovários, por exemplo).

Foram realizadas 400 avaliações ginecológicas com uso de ultrassonografia, onde foram identificados casos de presença de líquido no útero de algumas doadoras, além de cistos foliculares e luteínicos.

4.3 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO POR PALPAÇÃO RETAL

O diagnóstico de gestação por palpação retal é um método seguro, que não oferece risco à integridade da vaca ou do feto quando realizada adequadamente. É uma técnica eficiente, sua acuidade aproxima-se a 100% (GONÇALVES et al., 2002).

Com 30 dias de gestação, o útero está quiescente, mas nota-se presença de corpo lúteo e a vesícula embrionária na ponta do corno respectivo ao corpo lúteo, porém, em vacas com o útero muito grande o diagnóstico é intrincado (GONÇALVES et al., 2002).

Com 45 dias, a gestação pode ser precisamente diagnosticada, pois, a assimetria dos cornos uterinos respectiva ao corpo lúteo é palpável, devido ao acúmulo dos líquidos fetais, o útero fica com uma consistência elástica e é possível sentir o deslizamento das membranas fetais. Com 60 dias, o útero é facilmente palpável e o feto possui em torno de 9cm. Com 90 dias de gestação, se inicia a descida do útero (GONÇALVES et al., 2008).

Do 4o ao 7o mês a prova do baloteamento é positiva e o feto é dificilmente palpável, pois o útero está no assoalho abdominal, os placentomas são palpáveis e frêmito distinto da artéria uterina (GONÇALVES et al., 2008).

Por mais difícil que seja a palpação fetal, ela deve ser feita para uma correta confirmação de gestação.

Do 7o mês até o final da gestação, as porções fetais, placentomas e frêmito da artéria uterina são palpáveis (GONÇALVES et al., 2002).

A suposição da idade fetal é mais precisa no início da gestação.

Foram realizadas 400 palpações retais com finalidade de diagnóstico de gestação. Realizava-se palpação retal para diagnóstico de gestação a partir de 30 dias de gestação.

4.4 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO POR ULTRASSONOGRAFIA

A ultrassonografia é um método de diagnóstico que tem uma excelente acurácia, que permite detectar a gestação quando a fêmea está realmente prenha. A acurácia é superior a 95%, tão cedo quanto 26 dias após a fertilização (ou inseminação), e próximo de 100%, depois de 29 dias. O diagnóstico precoce permite que o veterinário proponha um novo programa de sincronização para as fêmeas que não ficaram gestantes, alcançando um maior sucesso nas taxas de produção em menor tempo possível (DESCÔTEAUX et al, 2010).

A acurácia do diagnóstico precoce de gestação varia muito e depende de alguns fatores, tais como: tipo e frequência do transdutor, repetição do exame, idade, raça e número de partições dos animais, dias pós cobertura ou inseminação, exame dos ovários, a experiência e as condições de trabalho do técnico (WOLF e GABALDI, 2002).

Com o transdutor pressionado no assoalho do reto, mantendo contato com a superfície dorsal do trato reprodutivo, o diagnóstico precoce de gestação nos grandes animais é realizado com a observação da vesícula alantoideana no corno uterino, bem como a detecção de um corpo lúteo no ovário (WOLF e GABALDI, 2002).

O diagnóstico de gestação por ultrassonografia pode ser realizado a partir do décimo terceiro dia de gestação, quando pode ser visualizado o embrião,

caracterizando-se como uma estrutura de ecogenicidade média no interior da vesícula embrionária, que é anecóica (GONÇALVES et al., 2002).

Esta técnica era realizada inserindo a probe linear, via trans-retal, e observando acúmulo de líquido uterino, anexos fetais, feto ou batimento cardíaco do feto. Este diagnóstico era realizado em média, aos 32 dias de idade.

Foram realizados 1820 diagnósticos de gestação por ultrassonografia.

4.5 SEXAGEM FETAL COM ULTRASSONOGRRAFIA

Segundo Kähn (1994), entre os dias 40 e 60 dias de prenhez, o tubérculo genital irá migrar em direção ao umbigo, em fetos machos, e em direção a base do rabo, em fetos fêmeas. O tubérculo genital irá se apresentar como uma estrutura ovóide bilobular com poucos milímetros e intensa ecogenicidade. Baseado na posição relativa do tubérculo genital, torna-se possível prever o sexo fetal a partir de 55 dias de gestação.

Foram realizadas 210 sexagens, utilizando-se ultrassom multi-frequencial , EXAGO da Universal, com probe linear, via trans-retal, para avaliar, a nível uterino o sexo do feto; fazia-se a sexagem entre 55 a 70 dias de idade dos fetos, sendo ideal a realização aos 60 dias de gestação. Para avaliar o sexo fetal é necessário encontrar o tubérculo genital, que na fêmea está na região perineal, logo abaixo da cauda visualizada de forma ecogênica e, no macho, é encontrado inserido ao cordão umbilical, também observado de forma ecogênica.

Após a visualização do tubérculo genital na região umbilical ou na perineal, o sexo é confirmado observando-se a ausência do tubérculo na região supostamente sem tubérculo.

4.6. REMOÇÃO DE FOLÍCULOS DOMINANTES (DFR)

A remoção de folículos dominantes (dominant follicle removal - DFR) em fêmeas doadoras de embriões ou fêmeas que seriam submetidas a aspiração folicular, foi atividade bastante realizada neste estágio.

A idéia de se fazer este procedimento, era regular da melhor maneira possível o início da nova onda folicular. Com o auxílio de um implante de progesterona + benzoato de estradiol ou GnRH no dia 0, a nova onda iniciaria de maneira uniforme (já que o folículo dominante que havia foi retirado) e as doses subsequentes do hormônio FSH durante o protocolo fariam com que houvesse uma estimulação de crescimento folicular constante (não favorecendo algum possível folículo dominante que houvesse, que no caso poderia então gerar um cisto folicular).

Durante o estágio foram realizadas 117 remoções de folículos dominantes.



FIGURA 3 - Remoção de folículos dominantes, realizada na empresa Sexing Technologies durante o estágio obrigatório, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.

4.7. SINCRONIZAÇÃO DE FÊMEAS PARA ASPIRAÇÃO FOLICULAR

Após serem feitas as seleções das fêmeas que estavam aptas e seriam submetidas a aspiração folicular, iniciavam-se os protocolos hormonais nas mesmas (obs: haviam alguns clientes que criavam fêmeas Brahman, e estas por terem uma dinâmica folicular boa, não eram submetidas aos protocolos da empresa, apenas eram normalmente aspiradas). O objetivo destes protocolos (geralmente utilizado em gado holandês) era dar início a uma nova onda folicular, com uso de implante de progesterona mais GnRH no dia 0. Com o início dessa nova onda, usava-se o hormônio FSH (o qual é responsável pelo crescimento folicular), a partir do terceiro dia deste protocolo, com três dias de aplicações (AM/PM) com doses decrescentes; já no sétimo dia os implantes de progesterona eram retirados e estas vacas eram aspiradas.

Segundo SIMONI et al.(1997), a ação do FSH sobre o crescimento folicular ocorre devido ao desencadeamento de uma cadeia de reações provocadas a partir da sua ligação com receptores localizados nas células da granulosa do ovário das fêmeas. Estes receptores de FSH estão presentes em folículos bem jovens com apenas 1 camada de células e, a medida que o folículo cresce (amadurece) embriões aumentam as camadas de células foliculares, os receptores de FSH também aumentam em quantidade e capacidade de ligação ao FSH, até o folículo atingir o estágio pré-ovulatório.

Durante o estágio sincronizou-se, usando o protocolo citado abaixo, 500 vacas.

DIA 0	DIA 1	DIA 2	DIA 3	DIA 4	DIA 5			
						DOSE TOTAL FSH = 10 CC.		
CIDR IN		FSH - Am	FSH - Am		CIDR OUT			
Remover DF Pm		FSH - Pm	FSH - Pm		OPU - Pm			
			44 HORAS					

FIGURA 4 - Protocolo para sincronização de fêmeas para aspiração folicular, utilizado na empresa Sexing Technologies durante o estágio obrigatório, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.

4.8. SINCRONIZAÇÃO DE RECEPTORAS DE EMBRIÃO

A sincronização das diversas receptoras de embrião era feita basicamente de duas maneiras: com o uso de protocolo hormonal de tempo fixo, ou com o uso de PGF2-alfa.

Essas receptoras, aptas a receberem os embriões, eram classificadas e separadas por lotes, utilizando o quesito raça e idade por exemplo, e, posteriormente, submetidas aos procedimentos.

As receptoras, submetidas ao protocolo hormonal, eram “tratadas da seguinte maneira”: Dia 0: implante de segundo uso de progesterona (CIDR - Pfizer) + 2 ml de benzoato de estradiol (sabe-se que o uso de um progestágeno mais um estrógeno no dia 0 do protocolo, leva ao início de uma nova onda folicular, pois a progesterona bloqueia um possível pico de LH, e o estrógeno bloqueia a liberação de FSH, ou seja, há uma atresia de determinados folículos e uma nova onda surge dentro de 2 a 3 dias); Dia 8: retirada do implante + 2 ml de PGF2-alfa (ESTRUMATE - MSD); Dia 9: 1ml de benzoato de estradiol e no Dia 10 pela tarde era dado como o possível momento da inseminação artificial (lembrando que como eram novilhas receptoras de embrião, não eram inseminadas e ficavam aguardando a inovulação dos mesmos 7 dias após o final do protocolo).

As receptoras que recebiam o tratamento com PGF2-alfa, ganhavam uma aplicação de 2 ml de cloprostenol sódico (ESTRUMATE - MSD) e um marcador na altura da cauda (este marcador ficava rosa quando esta novilha sofria uma monta que deveria indicar o cio). Após essa aplicação, as mesmas eram observadas duas vezes por dia, para que os cios fossem anotados, sabendo-se que os embriões seriam inovulados 7 dias após estes cios.

Vários estudos sobre o uso de prostaglandinas demonstraram que a variação do intervalo entre a aplicação aos sinais de cio e ovulação pode ser atribuída ao estado da onda folicular no momento do tratamento. Se a luteólise for induzida antes da metade do período estático do folículo dominante, indica que este será o folículo ovulatório, sendo que o intervalo tratamento-cio será curto entre 2 e 3 dias. Porém, se a luteólise for induzida após esse momento, o folículo ovulatório será da próxima onda folicular e o intervalo tratamento- cio será maior, entre 4 a 6 dias (BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S., 2007).

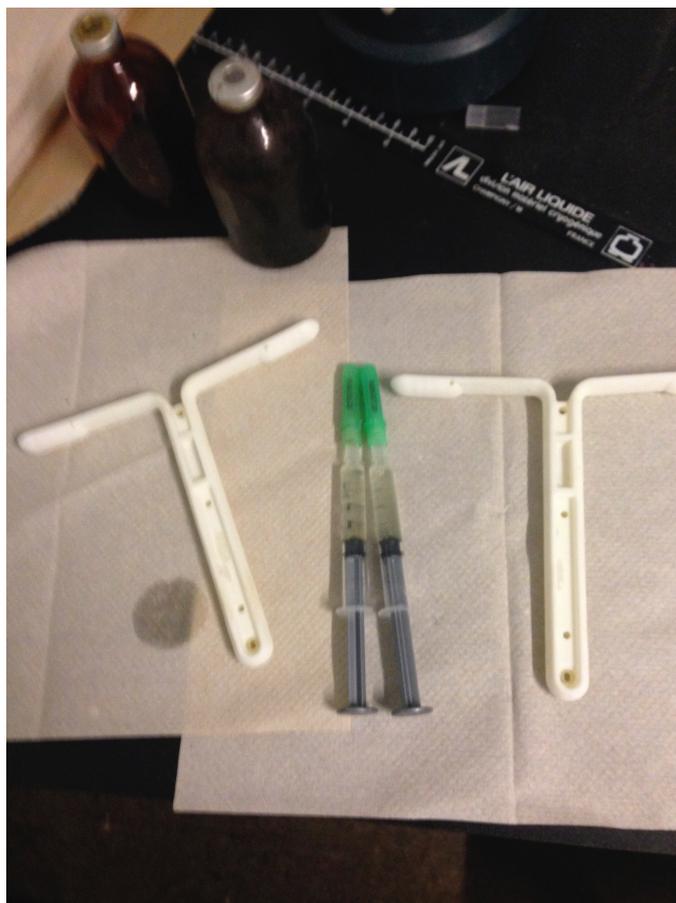


FIGURA 5 - Implante de progesterona (CIDR - Pfizer) e benzoato de estradiol, utilizados para sincronização de receptoras realizado na empresa Sexing Technologies durante estágio obrigatório, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.

4.9. SUPEROVULAÇÃO DE FÊMEAS PARA COLETA DE EMBRIÃO

O primeiro passo para dar início a uma coleta de embrião convencional (lavado convencional), é selecionar e avaliar a doadora em questão, ou seja, fazer todo o procedimento de análise da mesma, obtendo informações para saber se esta fêmea tem útero e ovários funcionais, que poderão proporcionar um tratamento de superovulação, como desejado.

Além da inseminação artificial, a indução de ovulação múltipla (superovulação – SOV) para a produção e transferência de embriões (TE) é uma das biotécnicas da reprodução mais importantes para acelerar o melhoramento genético do gado. Infelizmente, a variabilidade de resposta das doadoras de embriões ao tratamento superestimulatório com gonadotrofinas, continua a ser um dos maiores problemas

nos programas comerciais de TE (BARROS & NOGUEIRA, 2001), apesar das diversas pesquisas realizadas nesta área (NOGUEIRA ET AL; 2002).

A superovulação era realizada com o uso do hormônio FSH (Folltropin, Pluset), sendo que a utilização do FSH como agente indutor de superovulação tem sido extensivamente estudada; conseqüentemente, já foi testado o uso de diferentes concentrações (SAUNDERS ET AL, 1990) e vias de administração (TRIBULO ET AL, 1993), a eficiência de produtos comerciais das mais variadas marcas e procedências (Donaldson, 1989; Page et al., 1989; Del Campo et al., 1990; Donaldson, 1990a; Tribulo et al., 1993; Donaldson, 1995) e as variações na relação FSH:LH entre preparados comerciais (Donaldson & Ward, 1987; Donaldson, 1990b).

Para que não ocorressem falhas no procedimento de superovulação, as doadoras eram pré-sincronizadas com o uso de implante de progesterona + benzoato de estradiol no D0 (como um protocolo de IATF normal). Desta maneira, podia-se trabalhar com um “cio base”, ou seja, sabia-se em que fase do ciclo estral a doadora estava, antes de entrar no protocolo de superovulação propriamente dito.

Quatro dias após este cio base, o protocolo de SOV iniciava-se, e a doadora recebia implante de progesterona + 2 mg de benzoato de estradiol, sendo este o D0. A partir do D4 começavam as aplicações de FSH de maneira decrescente (variando as doses de acordo com cada animal), as quais se estendiam até o D7, onde o implante era retirado. No D8, essas doadoras recebiam aplicações de 2 ml de GnRH, e posteriormente, a primeira inseminação artificial com 14 horas pós GnRH, e outra 26 horas pós GnRH.

A SOV é o aumento do número fisiológico de ovulações, próprio de cada espécie, provocado através da administração exógena de gonadotrofinas. Nos bovinos, considera-se que houve resposta ao tratamento quando se conseguem mais de duas ovulações (PFEIFER et al., 2005). A SOV, portanto, é um método de estimular diversos folículos terciários a se desenvolverem até o estágio de pré-ovulação, com subsequente ovulação (RASI, 2005).

A resposta das doadoras a SOV apresenta grande variabilidade tanto na taxa de ovulação, quanto na produção de embriões viáveis. Há grande efeito da idade da doadora, do coeficiente de endogamia da doadora, da ordem de colheita, da dose da droga e do número de inseminações sobre esses resultados (PEIXOTO et al., 2002).

As doadoras podem ser superovuladas repetidamente a cada 40 dias, durante um período de 1 a 2 anos, com resultados satisfatórios (HASLER, 2003).

EC (Embryo Collection) DONOR PROTOCOL - w/ CIDR

Sexing Technologies

Senepol / Mario Brun

Reference Heat Protocol

EC (Embryo Collection) DONORS		
DATES of PROCEDURE	AM/PM	DONORS at CLINIC
Thursday, September 04, 2014		Cidr in + 2 cc EB
Friday, September 12, 2014		CIDR out + 5 cc Lutalize
Saturday, September 13, 2014		1 cc EB
Sunday, September 14, 2014		Reference Heat
	AM	
Thursday, September 18, 2014		CIDR IN + 2.0cc EB
Monday, September 22, 2014	AM	2.2cc FSH
	PM	2.0cc FSH
Tuesday, September 23, 2014	AM	1.8cc FSH
	PM	1.5cc FSH
Wednesday, September 24, 2014	AM	1.2cc FSH + 3cc Estrumate
	PM	1.0cc FSH + 2cc Estrumate
Thursday, September 25, 2014	AM	0.8 cc FSH
		and CIDR OUT
	PM	0.5 cc FSH
Friday, September 26, 2014	AM	HEAT+2cc Cystorelin
	PM	1st AI - 14 hours
Saturday, September 27, 2014	AM	2nd AI - 26 hours
	PM	
Friday, October 03, 2014	AM	EMBRYO COLLECTION
		11 cc Pluset

- 31417 (lost CIDR during reference Heat) - PRR 70355 - Reg. 1273273

T-2 {

- 31418 - CN 533N - Reg. 1112991
- 31420 - CN 712P - Reg. 1114747
- 31718 - CN 744P - Reg. 1115116
- 31747 - WC 8357L - Reg. 1111330
- 31750 - CN 244L - Reg. 1109244
- 31751 - WC 8421M - Reg. 1112798.

FIGURA 6 - Protocolo de superovulação utilizado em doadoras de embrião, durante o estágio obrigatório realizado na empresa Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.

4.10. COLETA DE EMBRIÃO

Após todo o processo de superovulação realizado nas doadoras, seguido das inseminações artificiais, era chegada a hora de coletar tais embriões produzidos, sendo que a lavagem uterina era realizada 6 a 8 dias após manifestação do cio do tratamento superovulatório.

A coleta normalmente era realizada com o animal posicionado em estação, por método transcervical, utilizando-se um sistema fechado. Para a coleta dos embriões, a doadora era contida e era realizada anestesia epidural caudal, administrando 4 a 5mL de lidocaína (entre S4 e Cc1). Posteriormente, realizava-se avaliação ginecológica, visando escolher o tamanho adequado da sonda de Folley, conforme tamanho do útero e avaliação da reação nos ovários depois da superovulação. Era, então, realizada higienização da região perineal com água e papel toalha, e, assim, introduzia-se a sonda de Folley, que era feita com auxílio de mandril, até a passagem da cérvix, inflando o balão no corpo do útero (remove-se o mandril e infla-se o balão com 10 a 20 ml de ar, para evitar refluxo de líquido durante a lavagem), lavando um corno de cada vez.

A lavagem pode ser feita no corpo do útero, portanto recuperam-se embriões dos dois cornos uterinos concomitantemente ou caso o útero seja grande, infla-se o balão da sonda de Folley e processa-se a lavagem individual de cada corno (GONÇALVES et al., 2008).

A “lavagem” dos cornos uterinos era feita com o uso de meio de coleta, um líquido chamado PBS, que é ideal para esses procedimentos, o qual não causa dano algum aos possíveis embriões ali presentes. Lavava-se cada corno uterino aproximadamente 10 vezes, massageando levemente, utilizando-se 500ml de PBS para cada. O PBS deve estar numa temperatura de 25 a 30 graus Celsius (ambiente). Eram mantidos 2-3 cm de líquido no filtro durante a lavagem, para que as estruturas não grudassem no fundo, e, ao final, o filtro com as estruturas coletadas seguia para o laboratório.

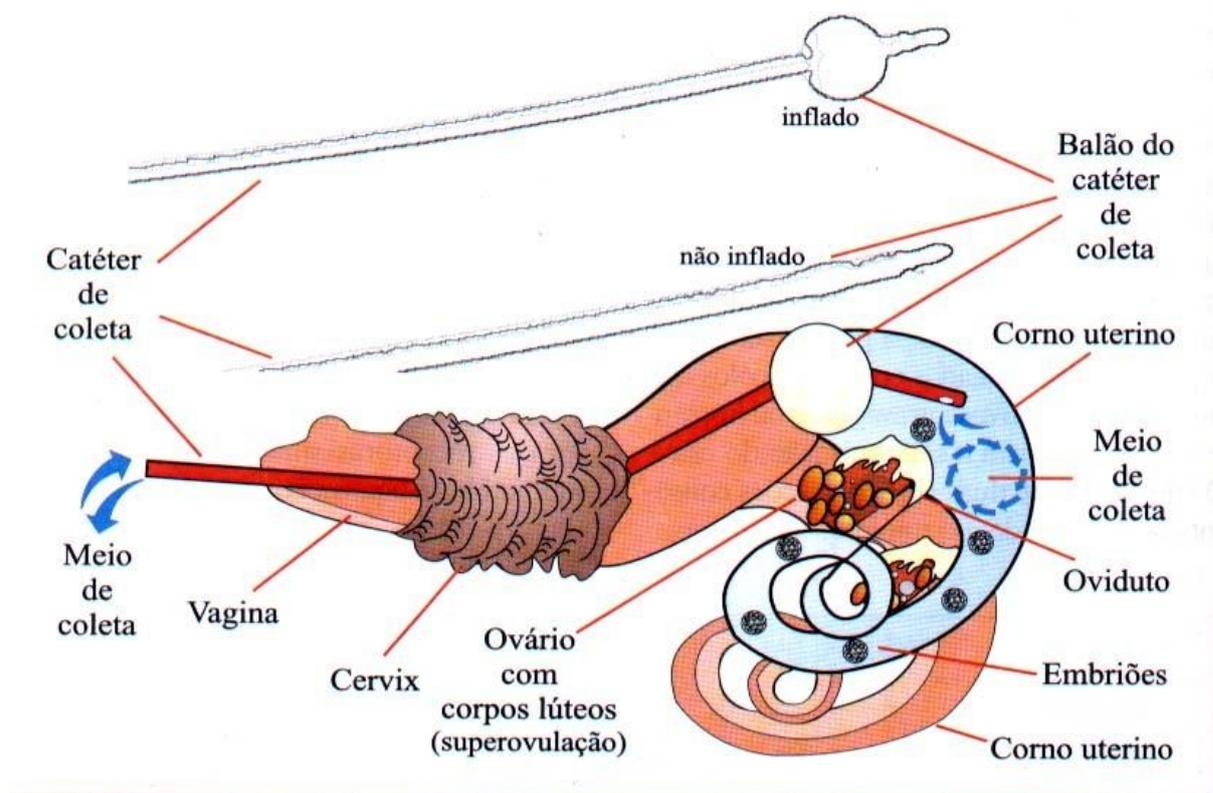


FIGURA 7 - Ilustração de estruturas envolvidas no procedimento de coleta de embriões, durante o estágio obrigatório realizado na empresa Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014. Fonte: Produção de embriões bovinos in vivo e in vitro (2012).

Após a lavagem uterina, o filtro (EZ filter) seguia para o laboratório onde era realizada a procura dos embriões. Realizavam-se, no mínimo, duas procuras completas removendo todas as estruturas viáveis e inviáveis (oócitos não fertilizados, por exemplo) encontradas. Os embriões viáveis encontrados eram avaliados e classificados segundo suas qualidades, dentro dos critérios da IETS (International Embryo Transfer Society; STRINGFELLOW e GIVENS, 2010):

EXCELENTE ou **BOM** (Grau I) – estágio de desenvolvimento corresponde ao esperado; massa embrionária simétrica e esférica com blastômeros individuais que são uniformes em tamanho, cor e densidade; forma regular, a Zona Pelúcida (ZP) não deve apresentar superfície côncava ou plana, deve ser lisa e, preferencialmente intacta; menos de 15% de células extrusadas.

REGULAR (Grau II) – estágio de desenvolvimento corresponde ao esperado; forma regular, ZP intacta ou não, irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho; pelo menos de 50% das células compõem

massa embrionária viável; menos de 15% de células extrusadas.

POBRE (Grau III) – estágio de desenvolvimento não corresponde ao esperado; irregularidades maiores na forma geral da massa embrionária ou no tamanho; menos de 75% das células degeneradas; pelo menos 25% das células compõem massa embrionária viável.

MORTO OU DEGENERADO (Grau IV) – estágio de desenvolvimento não corresponde ao esperado, embrião em degeneração; massa embrionária de menos de 25% de todo material celular presente no interior da ZP.

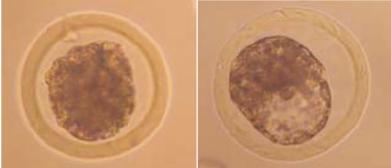
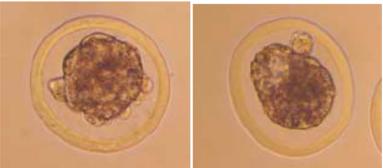
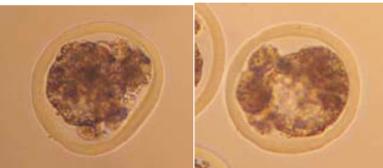
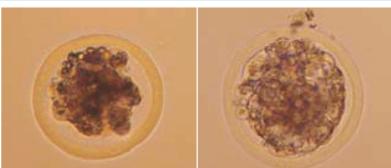
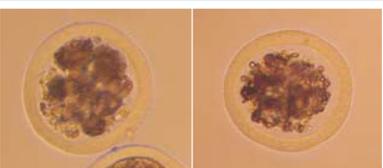
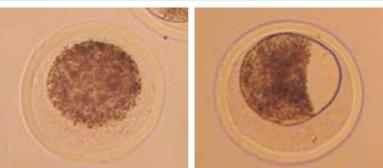
Classificação de embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> de acordo com a qualidade morfológica					
					
Embriões de qualidade excelente Código IETS: 1		Embriões de qualidade boa Código IETS: 1		Embriões de qualidade regular Código IETS: 2	
Comentários: Embriões sem defeitos morfológicos ou extrusões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

FIGURA 8 - Ilustração da classificação de embriões segundo a IETS (International Embryo Transfer Society), usada durante o estágio obrigatório realizado na empresa Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014. Fonte: IETS (International Embryo Transfer Society).

Além desta classificação de qualidade pelos critérios da IETS, os mesmos também são classificados de acordo com suas morfologias (também pela IETS), podendo ser: mórula (número 4), blastocisto inicial (número 5), blastocisto (número 6), blastocisto expandido (número 7), embrião em eclosão (número 8).

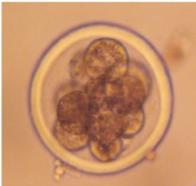
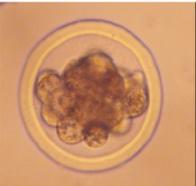
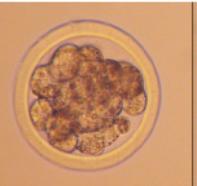
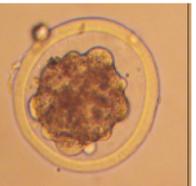
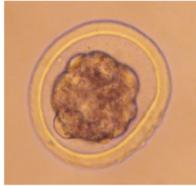
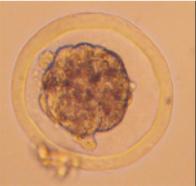
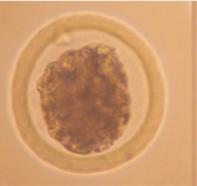
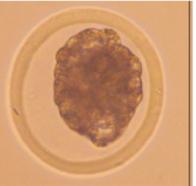
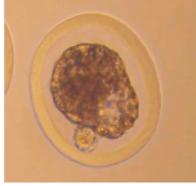
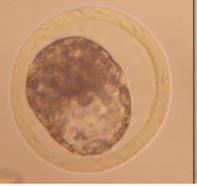
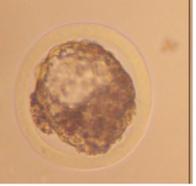
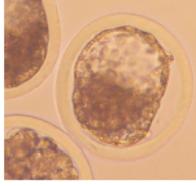
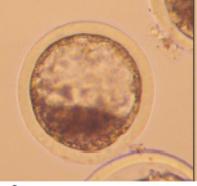
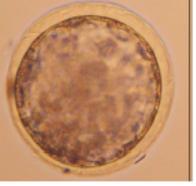
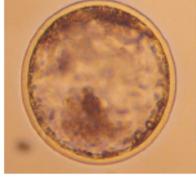
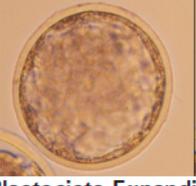
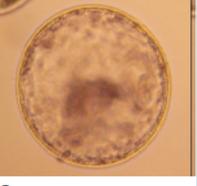
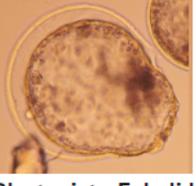
Classificação de embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> de acordo com o estágio de desenvolvimento				
				<p>Mórula Fase esperada: dias 5,5-6,0 do ciclo Características: Blastômeros ainda evidentes, porém não é mais possível determinar número exato. Massa de células ocupa maior parte do espaço dentro da zona pelúcida. Período caracterizado pelo fim da fase de celularização e da transição materno zigótica e início do processo de compactação.</p>
8 – 12 Células Código IETS: 2		Mórula Código IETS: 3		
				<p>Mórula Compacta Fase esperada: dias 6,0 a 6,5 do ciclo Características: Compactação torna a massa de células coesa, dificultando individualização dos blastômeros, e causa retração do embrião em relação à zona pelúcida, com aumento do espaço perivitelinico. Formação de junções de adesão e de oclusão entre as células, preparando o embrião para a formação da blastocèle.</p>
Mórula Compacta Código IETS: 4				
				<p>Blastocisto Inicial Fase esperada: dias 6,5 a 7,0 do ciclo Características: Blastômeros criam gradiente osmótico que atrai água para o espaço intercelular, iniciando a formação de uma cavidade denominada 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>
Blastocisto Inicial Código IETS: 5				
				<p>Blastocisto Fase esperada: dias 7,0 a 7,5 do ciclo Características: Blastocèle aumenta de tamanho, tornando-se proporcionalmente maior que a massa celular interna e ocupando gradualmente todo o espaço perivitelinico. Trofoblasto sofre diferenciações morfológicas e funcionais associadas à captação de nutrientes, enquanto as células da MCI mantêm potencialidade.</p>
Blastocisto Código IETS: 6				
				<p>Blastocisto Expandido Fase esperada: dias 7,5 a 8,0 do ciclo Características: 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>
Blastocisto Expandido Código IETS: 7		Blastocisto Eclodido Código IETS: 8		

FIGURA 9 - Ilustração da classificação de embriões segundo a IETS (International Embryo Transfer Society), usada durante o estágio obrigatório realizado na empresa Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014. Fonte: IETS (International Embryo Transfer Society).

4.11. CONGELAÇÃO DE EMBRIÃO

Após a coleta e análise desses embriões, era chegada a hora de congelar aqueles que tinham as melhores características, ou seja, embriões graus 1 e 2.

Usava-se uma placa que continha 6 poços, os quais eram preenchidos com holding (meio rico para lavagem desses embriões). O primeiro passo era colocar todas as estruturas encontradas na coleta no poço 1. O segundo passo era passar as estruturas boas (embriões grau I e grau II) para o segundo poço (então sabia-se quantos embriões seriam congelados, portanto eram feitas as etiquetas que vão em cada palheta de embrião, as quais mostram nome de pai e mãe, além de grau do embrião, etc). O terceiro passo era executar a lavagem desses embriões em poços com tripsina (2 poços sendo trinta segundos em cada um) e, para finalizar, lavava-se mais cinco vezes em poços de holding.

Com os embriões já lavados, o quarto passo era montar as palhetas, composta de acordo com a imagem abaixo.

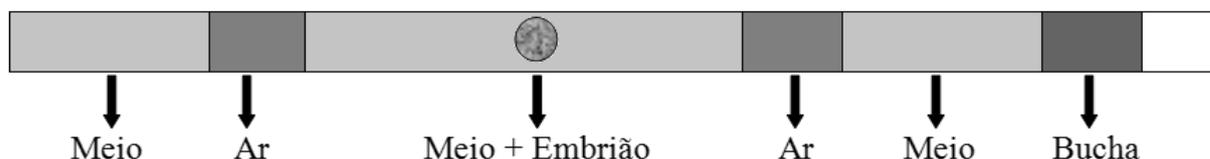


FIGURA 10 - Ilustração do envasamento do embrião na palheta, usado durante o estágio obrigatório realizado na empresa Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014. Fonte: Produção de embriões bovinos in vivo e in vitro (2012).

O meio que compunha a palheta era o etileno glicol, e esta recebia uma “tampa” na extremidade oposta da bucha, chamada de rollts (levava a etiqueta do embrião com os dados do mesmo).

Em seguida, estes embriões que já se encontravam nas palhetas, eram colocados na máquina de congelação, previamente ajustada a -6,5 graus Celsius. Após colocar a ultima palheta dentro da máquina, eram contados dois minutos, para que se pudesse iniciar um processo chamado cristalização.

Essa cristalização nada mais era do que colocar um swab com ponta congelada por nitrogênio líquido na parte da palheta que continha ar (o nitrogênio do

swab começa a congelar o restante da palheta lentamente, atingindo o embrião).

Quando se cristalizava a última palheta, o cronômetro contava dez minutos, e então o processo de congelação era reestabelecido na máquina que estava a -6,5 graus Celsius.

Por fim, esta máquina passava por uma queda de temperatura de um grau a cada cinquenta segundos, até atingir -32 graus Celsius (esse procedimento final durava em torno de 40 minutos). Aí, então, os embriões estavam congelados e prontos para serem acondicionados em tanques de nitrogênio líquido.

4.12. INOVULAÇÃO DE EMBRIÃO

A transferência dos embriões coletados ou produzidos pela FIV, durante o período de estágio, aconteceu com grande frequência, já que a demanda de vacas aspiradas e/ou superovuladas era grande.

Assim que as receptoras entravam no “shut”, as mesmas eram contidas e, através da palpação retal acompanhada de ultrassonografia sabia-se qual ovário tinha ovulado. As receptoras deveriam estar sincronizadas com a idade do embrião, ou seja, se o embrião tinha 7 dias, a receptora deveria ter ciclado 7 ± 1 dias atrás.

Se a receptora estava apta a receber o embrião, era anestesiada de maneira epidural caudal, com lidocaína, usando 5ml. O responsável pela inovulação do embrião localizava o ovário que tinha corpo lúteo, já que a TE ou inovulação consiste na deposição do embrião no terço médio-final do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo. Utilizando aplicador semelhante ao utilizado na inseminação artificial, passava-se a cérvix, realizando-se a inovulação o mais cranialmente possível, na luz do corno uterino ipsilateral ao CL.

Durante o estágio foram realizadas 2000 inovulações.



FIGURA 11 - Ilustração dos inovadores de embrião já montados, durante o estágio obrigatório na empresa Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014.

4.13. PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIV)

As diversas vantagens e aplicações da produção *in vitro* de embriões (PIV) estão relacionadas à: determinação e controle do sexo dos produtos; aumento da eficiência dos programas de produção; rápidas e melhores possibilidades para executar programas de cruzamento; avaliação do efeito materno sobre a descendência; rápida multiplicação de raças; facilidade de importação e exportação de material genético da fêmea; formação de bancos de gametas congelados; aumento da eficiência do sêmen congelado de alto valor genético; e estudo e desenvolvimento de outras biotécnicas reprodutivas a partir da micromanipulação de gametas e embriões (GONÇALVES et al., 2002).

4.13.1. RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS

O primeiro passo para que se possa produzir embriões em laboratório é fazer a aspiração folicular nas doadoras, ou seja, tentar da melhor maneira possível aspirar os folículos presentes nos ovários, para que haja a recuperação de oócitos, preferencialmente viáveis.

Essa aspiração acontecia, de segunda a quinta feira, sendo que as doadoras geralmente eram das raças Holandês, Brahman e Senepol.

A aspiração folicular, propriamente dita, ocorria da seguinte maneira: a doadora era contida em estação; era feita a retirada das fezes do reto e logo uma anestesia epidural com 5 ml de lidocaína; a vulva era limpa com álcool e papel toalha; e em seguida a probe de aspiração era introduzida pela vulva até o fundo da vagina (a mão do aspirador que está no reto tem função de segurar o ovário durante a aspiração, já a probe faz a imagem e punciona os folículos presentes).

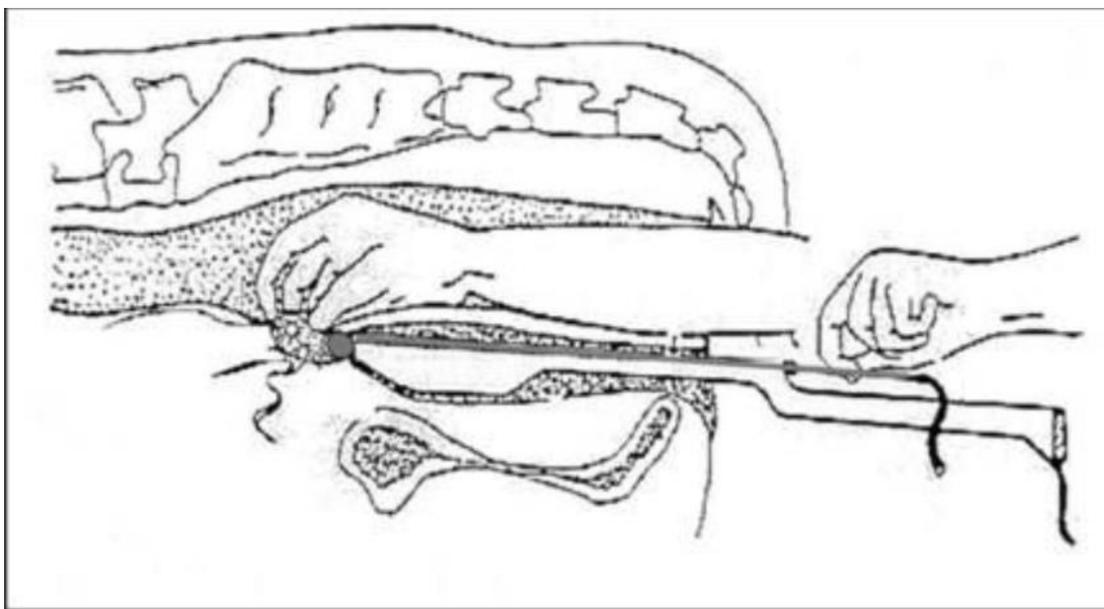


FIGURA 12 - Ilustração da aspiração folicular, realizada durante o estágio obrigatório na empresa Sexing Technologies, no período de 04/08/2014 a 18/11/2014. Fonte: Produção de embriões bovinos in vivo e in vitro (2012).

Havia uma bomba de vácuo com pressão de 100mmHg que fazia com que o líquido presente nos folículos, após a punção, viesse através do sistema e chegasse até o tubo, o qual era encaminhado ao laboratório.

4.13.2. CLASSIFICAÇÃO DE OÓCITOS

Era realizada a busca dos oócitos para que houvesse a classificação dos mesmos, sendo estes classificados em viáveis (grau I, grau II, grau III), e não viáveis (desnudos, expandidos, atrésicos e degenerados).

Oócito grau I: há a presença de mais de três camadas de células do *cumulus* e o mesmo é compacto; ooplasma uniforme de coloração marrom e que preenche todo o espaço até a zona pelúcida.

Oócito grau II: oócitos com menos de três camadas de células do *cumulus*. Ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche todo espaço interior da zona pelúcida (LEIBFRIED E FIRST, 1979).

Oócito grau III: oócitos com uma ou duas camadas de células; podem ou não apresentar o ooplasma retraído; coloração não homogênea.

Oócito desnudo: não apresenta nenhuma camada de células ao seu redor; ooplasma pode estar ou não retraído.

Oócito expandido: células do *cumulus* não estão compactas, e normalmente o ooplasma já se encontra mais fragmentado.

Oócito atrésico: as células do *cumulus* já estão expandidas formando grânulos; ooplasma normalmente retraído com aspecto degenerado.

Oócito degenerado: são oócitos que apresentam citoplasma claro, retraído, fragmentado.

4.13.3. MATURAÇÃO DE OÓCITOS

Para que o oócito esteja apto a ser fecundado e posteriormente se desenvolver até o estágio de blastocisto, precisa ser maturado e, durante essa fase, sofrer diversas transformações, tanto em seu citoplasma quanto em seu núcleo.

O processo de maturação consiste na evolução dos oócitos da fase prófase I

para metáfase II, sendo que nessa fase estão aptos a serem fertilizados.

O período de maturação *in vitro* varia de 18 a 24 horas em atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007).

4.13.4. FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

Passado o período necessário para que ocorresse a maturação dos oócitos, os mesmos eram transferidos para um meio de fertilização (o qual contém componentes importantes para a capacitação dos espermatozoides), era chegado o momento de fertilizá-los.

O sêmen a ser utilizado, passava por um processo de centrifugação (a técnica de preparo do sêmen para a FIV, varia de acordo com o tipo de sêmen, sendo ele convencional, sexado ou revertido) que tem por finalidade separar os espermatozoides vivos dos mortos, além de separar o plasma seminal, os crioprotetores e qualquer tipo de sujidade que possa estar presente. Após a centrifugação deste sêmen, o sobrenadante era retirado, e o pellete avaliado; se estivesse com boa qualidade era, então, usado para a fertilização.

O co-cultivo (espermatozoide e oócito) é realizado em temperatura de 39°C, atmosfera com 5% de CO₂ e umidade saturada.

4.13.5. CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Após 18 a 24 horas da fertilização, era realizada uma limpeza nos zigotos para a retirada de células mortas, espermatozoides mortos e/ou vivos; após essa limpeza (lavagem dos zigotos), passava-se os mesmos para uma placa de cultivo, a qual tem um meio que proporciona o crescimento e desenvolvimento embrionário.

Passadas aproximadamente 24 horas, estes zigotos eram reavaliados (chamado de D2), e os que apresentavam clivagem eram transferidos para outro meio de cultivo, no qual as estruturas (futuros embriões) eram mantidas até o dia da transferência.

4.13.6. VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES

Decorrido todo o procedimento de produção in vitro de embriões, estes eram levados para serem inovulados nas receptoras previamente sincronizadas. Porém, há vezes em que faltavam receptoras ou o cliente desejasse que seus embriões fossem congelados. Aí entra o processo de vitrificação destes embriões.

O princípio da vitrificação consiste em submeter os embriões a altas concentrações de crioprotetores, com a finalidade de aumentar a viscosidade dos meios intra e extracelulares. Sendo assim, torna-se possível resfriar os embriões, passando-os do estado líquido ao estado vítrio (gel amorfo), sem a formação de cristais de gelo intra e extracelular (KASAI, 1996).

A vitrificação evita a formação de cristais de gelo intracelulares e extracelulares que são os responsáveis pela danificação das membranas e organelas celulares. Esse processo é determinado pelo uso de crioprotetores de alta concentração e rápidas taxas de resfriamento e aquecimento (PAPADOPOULOS et al., 2002).

Na prática, existem diversas misturas de crioprotetores intracelulares e extracelulares que vem sendo usados e aprimorados para um melhor resultado (DOBRINSKY, 2002).

A empresa realizava a vitrificação de seus embriões com um protocolo específico, o qual não tínhamos acesso, e, após todo o procedimento, os mesmos eram armazenados em um botijão com nitrogênio líquido.

5. CONCLUSÃO

Os dias vividos durante este estágio serviram como grande bagagem em minha formação, pois lá pude conhecer muitas pessoas e profissionais da área, além de adquirir conhecimentos que complementaram as atividades e informações fornecidas pela Universidade Federal do Paraná.

O mesmo serviu para aumentar o desejo de trabalhar na área escolhida, pois pude colocar em prática muitos conceitos adquiridos e percebi que, apesar da pouca experiência, sinto-me apto a iniciar neste mercado de trabalho.

Os conhecimentos oferecidos pela UPFR foram de suma importância, porém notei que em certas ocasiões as situações encontradas a campo se confrontam, e nessas horas precisamos usar o que temos em mãos, esquecendo toda a estrutura que havia na universidade e buscando uma melhor saída e resolução para o problema.

As biotécnicas da reprodução estão em constante avanço, principalmente no Brasil quando falamos em Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) ou Transferência de Embriões (TE), sendo este um mercado promissor para nós que estamos a um passo de ser Médicos Veterinários.

A escolha da área de estágio é essencial para o acadêmico focar e se dedicar mais na área em que pretende atuar. Levando isso em consideração, um bom estágio curricular depende da sua escolha, pois só conseguirá se dedicar ao máximo e trabalhar com atenção e satisfação nas áreas de afinidade e/ou interesse profissional.

Por fim, conclui-se que as biotécnicas acompanhadas durante o estágio curricular obrigatório realizado na empresa Sexing Technologies, deixaram evidente a excelente relação custo-benefício das mesmas, quando bem aplicadas e executadas, levando a produção de embriões que trazem um grande avanço a genética de um rebanho. Este estágio ficará marcado na minha formação profissional. Lá obtive muitos conhecimentos e claro, também fiz amizades, as quais levarei comigo durante esta nova etapa que está se iniciando.

6. SUGESTÕES

Dentro do estágio curricular obrigatório, minha sugestão é mudar o horário de trabalho com os animais da raça Holandesa, pois os mesmos sofrem demasiadamente com o clima da região (College Station, TX), onde as vezes tem-se a marca de 43 graus Celsius. Esse estresse térmico prejudica de maneira acentuada a questão reprodutiva destas fêmeas (resposta a protocolos hormonais, por exemplo), e uma opção seria manejá-las nos horários mais frescos do dia.

REFERÊNCIAS

- ADAMS GP. 1994. **Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation.** Theriogenology, 4:19-24.
- ARMSTRONG, D.T. **Recent advances in superovulation of cattle.** Theriogenology, v.39, p.:7-24, 1993.
- BARUSELLI et al; **Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.31, p.205-211, 2007.
- BARROS, C.M. & NOGUEIRA, M.F.G. **Embryo transfer in Bos indicus cattle.** Theriogenology, v.56, p.1483-1496, 2001. RENESTO, A.; COELHO, L. A. **Associação das biotécnicas: Aspiração folicular guiada por ultrassonografia e superovulação na produção in vitro e in vivo de embriões bovinos.** Tese (Mestrado). Arquivos da Faculdade de Ciências Agrárias UNESP. p.17-31., 2004.
- BOLAND, M.P.; CROSBY, T.F.; GORDON, I. **Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG.** Theriogenology, v .10, p.175, 1978.
- DESCÔTEAUX, L.; GNEMMI, G.; COLLOTON, G. **Principles and recommendations in ultrasound imaging.** In: Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography. p. 23-25, 1a ed. Editora Willey Blackwell, USA, 2010
- DONALDSON LE, WARD DN, GLENN SD. **Use of porcine follicle stimulating hormone after chromatographic purification in superovulation of cattle.** Theriogenology 1986;25:747-57.
- DOBRINSKY, J.R. **Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos.** Theriogenology, v.57,p. 285-302, 2002.
- FIGUEIREDO JR, RODRIGUES APR, AMORIM CA, SILVA JRV. **Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais.** In: Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2.ed. São Paulo: Roca, 2007. p.303-327.
- 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.**

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo, SP, editora Varela, 2002. 340 p.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F.. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. 395 p.

GRIFFIN, P. G.; GINGTHER, O. J. **Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology**. *Journal of Animal Science*. p. 954, 2002. disponível em: <jas.fass.org/content/70/3/953> acessado em 07/10/2014.

HASLER JF. 2003. **The current status and future of commercial embryo transfer in cattle**. *Anim Reprod Sci*, 79:245-264.

HOCKLEY DK, BÓ GA, PALASZ AT, DEL CAMPO MR, MAPLETOFT RJ. **Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin in the cow: effect of dose and site of injection**. *Theriogenology* 1992;37:224.

HYTTEL P, CALLESEN H, GREVE T, SCHMIDT M. **Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle**. *Theriogenology* 1991;35:91-108.

KASAI, M. **Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos**. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 42, p. 67-75, 1996.

KAHN, W. **Veterinary Reproductive Ultrasonography**. 2 ed. Hannover, Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei GmbH & Co, 1994. 256 p.

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.

PAPADOPOULOS, S., RIZOS, D., DUFFY, P., WADE, M. et al. **Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts**. *Anim. Reprod. Sci.*, v.74, p. 35-44, 2002.

PEIXOTO, M.G.C.D.; FONSECA, C.G.; PENNA, V.M.; ALVIM, M.T.T. **Multivariate analysis of multiple ovulation followed by embryo transfer results from zebu donors, 2002**.

PFEIFER, L. F. M.; CORRÊA, M. N. ; PINESCHI, L. E. **Universidade Federal de Pelotas: Alternativas hormonais para programas de transferência de embriões em bovinos, Faculdade de Veterinária, 2005.**

RUMPF, RODOLFO. **Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões.** R. Bras. Zootec. vol.36 suppl.0 Viçosa July, 2007. Acessado em 24/09/2014.

RASI, F.P.A. **Técnicas de superovulação, colheita e transferência de embriões em bovinos.** Botucatu, 2005. 27p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista.

REVISTA BRASILEIRA DE REPRODUÇÃO ANIMAL, v.31, p.212-217, 2007.
GRUNERT, E., BIRGEL E. H., VALE W. G., **Patologia e Clínica da Reprodução dos Animais Mamíferos Domésticos.** São Paulo: Varela, 2005. 551 p.

RENESTO, A.; COELHO, L. A. **Associação das biotécnicas: Aspiração folicular guiada por ultrassonografia e superovulação na produção *in vitro* e *in vivo* de embriões bovinos.** Tese (Mestrado). Arquivos da Faculdade de Ciências Agrárias UNESP. p.17-31., 2004.

SBTE, SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES. **Mudanças de tendências no Mercado de embriões bovinos no Brasil.** Jornal O Embrião. v.42, p.5-7, 2009.

STRINGFELLOW DA, GIVENS, MD. 2010. **Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS).** 4th ed. Champaign, IL: IETS.

SIMONI, M., BAKKER, E., EURLINGS, M. C., MATTHIJS, G., MORO, E., MU'LLER, C. R. & VOGT, P. H. (1997).

TRIBULO H, JOFRE F, CARCEDO J, ALONSO A, TRIBULO R, BÓ GA. **Superovulation in *Bos indicus* cattle with a single subcutaneous injection of commercial pituitary extracts.** Theriogenology 1993;39:331.

WOLF, A.; GABALDI, S. H. **Acompanhamento ultrassonográfico da gestação em grande animais II.** Ciências Agrárias e Saúde. v 2. n 2. FEA, Andradina. pp 79-82, 2002.

