

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA CURSO DE
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**SINCRONIZAÇÃO DA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR, NA PRESENÇA
OU AUSÊNCIA DE P4 COM OPU ANTES DA DIVERGÊNCIA DA ONDA**

OTHON FERNANDES BISOL

Campo Grande – MS

2024

OTHON FERNANDES BISOL

**SINCRONIZAÇÃO DA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR, NA PRESENÇA
OU AUSÊNCIA DE P4 COM OPU ANTES DA DIVERGÊNCIA DA ONDA**

OTHON FERNANDES BISOL

Orientador : Prof. Dr. Gustavo Guerino
Macedo

Trabalho de Conclusão de Curso de
Graduação em Medicina Veterinária
apresentado à Universidade Federal do
Mato Grosso do Sul, como requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Medicina Veterinária

CAMPO GRANDE– MS

2024

OTHON FERNANDES BISOL

Relatório final de estágio obrigatório apresentado no dia 21 de Novembro de 2024 e avaliado pela banca examinadora:

Prof. Dr. Gustavo Guerino Macedo
Presidente

Prof. Dra. Eliane Vianna Costa e Silva

Med.Vet. Moisés Máximo Rodrigues Júnior

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proteger em todos os momentos da minha vida e por ter a oportunidade de estar aqui hoje.

Agradeço imensamente a minha mãe, Shirlei Ferreira Fernandes, que apesar de todas as dificuldades nunca me deixou desamparado e fez de tudo para que esse dia finalmente chegasse, sem ela com certeza eu não estaria aqui. Ao meu padrasto, Luis Carlos Sanematsu que junto a minha mãe me proporcionou a oportunidade de concluir o ensino superior.

Agradeço minha namorada, Andressa Dutra Resstel que percorreu todo esse caminho ao meu lado sempre me apoiando e incentivando a continuar, sempre presente nos momentos bons e ruins. A minha sogra Patricia Dutra, que junto a sua filha me receberam de braços abertos em sua casa e que também foi de grande importância para essa realização.

Agradeço a minha irmã, Thamara Fernandes Bisol Filgueiras e meu cunhado, Rodrigo da Rocha Filgueiras, que também fazem parte dessa realização pois sempre estiveram dispostos a me ajudar e o fizeram de todo coração.

Agradeço em geral a toda a minha família, pois deles sempre recebi todo o apoio necessário para estar aqui hoje.

Agradeço também aos amigos que estiveram presentes em todos os momentos até aqui.

Agradeço a todos os professores que tive a oportunidade de conhecer durante a graduação e que se dispuseram sempre a passar o seu conhecimento e experiência na Medicina Veterinária.

Agradeço ao meu orientador, Gustavo Guerino Macedo, por ter aceitado o convite e por ter contribuído muito para minha formação acadêmica.

Agradeço à empresa Ms Reprodução e aos médicos veterinários Moisés Máximo Rodrigues Júnior, Wendell Nantes e Igor Dias por terem me recebido e não terem medido esforços para passar todo seu conhecimento e experiência prática, que eu sempre levarei como base para construção da minha carreira profissional.

Finalizando agradeço a todos que torceram e torcem por mim.

Obrigado!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. CAPÍTULO 1: Relatório final de estágio obrigatório na área de reprodução de bovinos.....	6
2.1. LOCAL DE ESTÁGIO.....	6
2.2. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS.....	7
2.2.1. Inseminação artificial em tempo fixo (IATF).....	7
2.2.2. Aspiração folicular guiada por ultrassom (ovum pick up - OPU).....	11
2.2.3. Transferência de embriões em tempo fixo (TETF).....	13
2.2.4. Diagnóstico gestacional (DG).....	14
2.2.5. Exame andrológico.....	15
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	17
4. CAPÍTULO 2. Projeto de Pesquisa: Sincronização da onda de crescimento folicular, na presença ou ausência de p4 com opu antes da divergência da onda.....	18
4.2. INTRODUÇÃO.....	19
4.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.3.2. Protocolos.....	20
4.3.3. OPU.....	21
4.3.4. Busca e classificação dos oócitos.....	22
4.3.5. Fecundação in vitro.....	23
4.3.5.1. Maturação in vitro dos oócitos (MIV).....	23
4.3.5.2. Fertilização in vitro dos oócitos (FIV).....	23
4.3.5.3. Cultivo in vitro dos embriões (CIV).....	23
4.3.6. Análise estatística.....	24
4.4. RESULTADOS.....	24
4.5. DISCUSSÃO.....	26
4.6. CONCLUSÃO.....	28
4.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

1. INTRODUÇÃO

A reprodução é um dos pilares fundamentais para a eficiência e sustentabilidade na pecuária de corte. No Brasil, que é um dos maiores produtores e exportadores de carne bovina do mundo, o manejo reprodutivo adequado tem um impacto direto na produtividade, rentabilidade e competitividade do setor. O Médico Veterinário desempenha um papel essencial nesse contexto, sendo responsável pela gestão da saúde reprodutiva dos rebanhos, utilizando conhecimentos técnicos e científicos para melhorar a taxa de concepção, reduzir os índices de infertilidade e promover o bem-estar animal.

Este relatório de estágio tem como objetivo apresentar as atividades realizadas durante o período de estágio supervisionado do graduando Othon Fernandes Bisol, do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), com foco na atuação do Médico Veterinário na reprodução de bovinos de corte, onde serão discutidas as técnicas reprodutivas mais utilizadas. O estágio proporcionou uma visão prática e aprofundada das questões que envolvem a reprodução na pecuária de corte, contribuindo para o desenvolvimento profissional e pessoal.

As atividades foram desenvolvidas na empresa MS Reprodução, que atende diversas propriedades no estado de Mato Grosso do Sul, Goiás e também fazendas no Paraguai, no período de 27 de maio de 2024 a 15 de novembro de 2024, totalizando 960 horas, sob a supervisão do médico veterinário Moisés Máximo Rodrigues Júnior e sob orientação acadêmica do Prof. Dr. Gustavo Guerino Macedo.

2. CAPÍTULO 1: Relatório final de estágio supervisionado na área de reprodução de bovinos.

2.1. LOCAL DE ESTÁGIO

O escritório da empresa MS Reprodução é referência na área de reprodução de bovinos, e fica localizado na rua Dias Ferreira, 82 - Cooprafe, Campo Grande – MS.

Conta com dois sócios proprietários, Moisés Máximo Rodrigues Junior e Wendell Amaral Nantes de Oliveira, ambos Médicos Veterinários e responsáveis por todas as atribuições e serviços prestados como: Inseminação artificial em tempo fixo (IATF); transferência de embriões em tempo fixo (TETF); diagnósticos gestacionais (DG); aspiração folicular (*ovum pick – up* - OPU); exames andrológicos e também a comercialização de sêmen bovino.

2.2. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

As atividades desenvolvidas foram voltadas para a reprodução de bovinos de corte, incluindo avaliações ginecológicas de fêmeas bovinas, protocolos de IATF, TETF, OPU, DG e exames andrológicos. Além disso, também pude acompanhar a rotina de avaliação de animais e das propriedades antes do início da estação de monta, onde foram planejados todos os processos e selecionados os animais que iniciaram os protocolos hormonais, escolhendo a melhor data para início das atividades e o melhor protocolo a ser utilizado.

2.2.1 Inseminação artificial em tempo fixo

Ao longo do estágio foram acompanhados os procedimentos de inseminação artificial e todos os manejos previamente realizados até a etapa de inseminação. Ao início do protocolo, o aparelho reprodutivo de todas as fêmeas foram avaliados pelo médico veterinário por meio de palpação retal ou com auxílio do aparelho ultrassonográfico (US), selecionando as fêmeas aptas a iniciar o protocolo. Foi utilizado como critério para descarte o trato reprodutivo com anomalias (freemartinismo), trato reprodutivo não desenvolvido, fêmeas com problemas anatômicos (úbere ou cascos) e escore de condição corporal desfavorável (abaixo de 2,0 em uma escala de 1 = magra e 5 = obesa).

Os protocolos hormonais foram montados de acordo com a categoria do animal (novilhas superprecoces e tradicionais, primíparas e pluríparas) e também com o calendário da fazenda, sendo divididos em 3 ou 4 manejos e variando os dias e as doses usadas conforme os medicamentos utilizados.

Para o protocolo de IATF, no D0 foi inserido um implante de progesterona (P4; CIDR[®], Zoetis, Brasil), de 3^o ou 4^o uso no caso de novilhas e superprecoce. Foi aplicado 2 mg de benzoato de estradiol (Gonadiol[®], Zoetis, Brasil) via intramuscular (i.m.), podendo ou não receber 12,5 mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse[®], Zoetis, Brasil) i.m. quando houvesse a presença de corpo lúteo, porém a administração ficava a critério do médico veterinário e da propriedade.

A segunda etapa do protocolo dependia do número de manejos. No protocolo de 3 manejos, o implante de P4 poderia ser retirado no D7, D8 ou D9 e, no dia da retirada, aplicava-se 0,6 mg de cipionato de estradiol (E.C.P. [®], Zoetis, Brasil) i.m., 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (Novormon[®], Zoetis, Brasil) i.m. e 12,5 mg de Dinopost Trometamina(Lutalyse[®], Zoetis, Brasil) i.m. 48 horas após a retirada, realizava-se a inseminação artificial (figura 2).

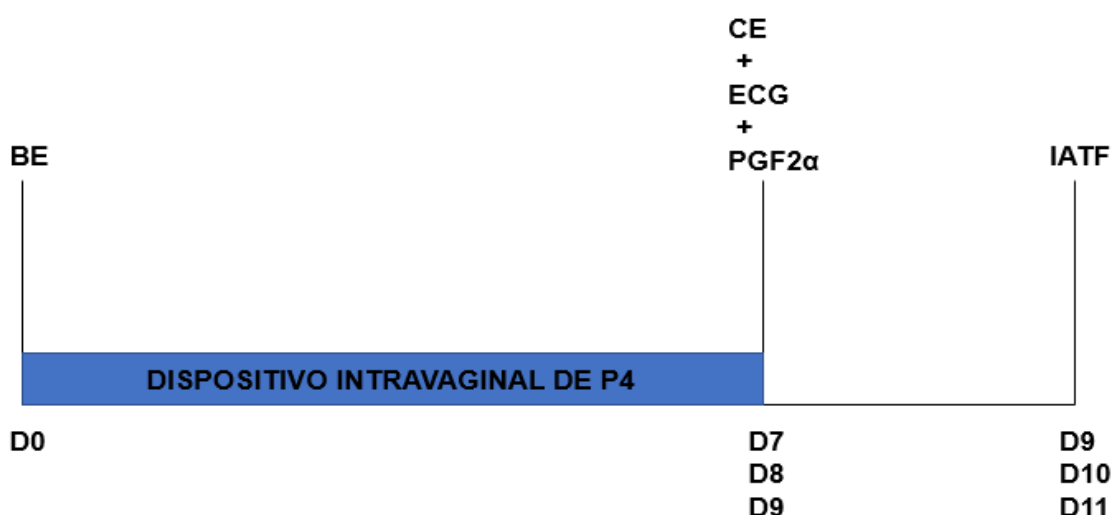


Figura 2. Protocolo de (IATF) com três manejos para sincronização de ovulação e realização da inseminação artificial 48 hrs após a retirada.

No protocolo de 4 manejos, a segunda etapa ocorria no D7 com a injeção de 12,5 mg de Dinopost Trometamina(Lutalyse[®], Zoetis, Brasil) i.m. No D9, foi realizada a retirada do implante de P4 com a administração de 0,6 mg de cipionato de estradiol (E.C.P. [®], Zoetis, Brasil) i.m., 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (Novormon[®], Zoetis, Brasil) i.m. e 48h após a retirada, os animais foram inseminados (Figura 3).

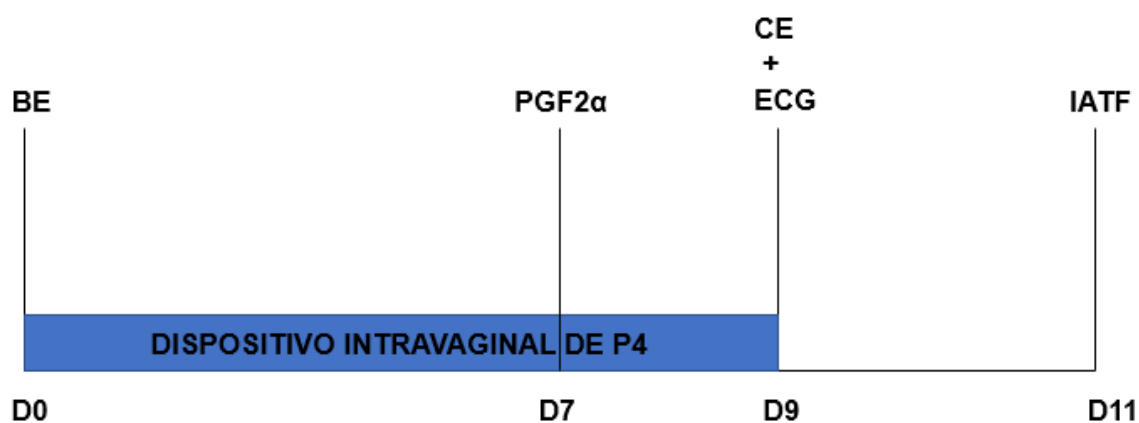


Figura 3. Protocolo de (IATF) com quatro manejos para sincronização de ovulação e realização da inseminação artificial 48 hrs após a retirada



Figura 4. Mesa de IATF contendo seguintes materiais: descongelador, aplicador, pinça anatomica, tesoura, papel toalha e álcool.



Figura 5. Montagem do aplicador de sêmen utilizando palheta de 0,25 ml, para realizar o procedimento de inseminação artificial (IA).



Figura 6. Procedimento de IA realizado em fêmea bovina protocolada e apresentando cio (estro).

2.2.2. Aspiração folicular guiada por ultrassom

As aspirações foliculares foram realizadas em animais previamente selecionados, seguindo critérios morfológicos e genéticos. No dia da aspiração, os animais poderiam estar ou não protocolados e, no momento da aspiração, as fêmeas foram devidamente contidas e receberam 100 mg de lidocaína (Lidovet®, Bravet, Brasil) epidural. Após essa etapa, a guia de aspiração era introduzida na vagina da fêmea até o fórnix e o ovário aproximado da ponta da guia. Após gerar uma imagem satisfatória, os folículos de ambos os ovários foram aspirados independentemente do seu diâmetro (Figura 8). Posterior à aspiração de todos os folículos, realizou-se a aspiração de 20 mL de soro fisiológico a 0,9% para recuperar os oócitos que eventualmente ficavam no interior da agulha.

Os oócitos aspirados então foram levados até o laboratório montado ao lado do curral (Figura 9) para que o rastreador selecionasse e classificasse os mesmos de acordo com as características das células do complexo *cumulus oophorus* (CCO) e do ooplasma, que podem ser classificados, de acordo com Seneda (2001) em: Grau I (GI) – *Cumulus* compacto presente, contendo mais de três camadas de células e ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom (ou presente mais do que três fileiras de células do *cumulus*); Grau II (GII) – *Cumulus* compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares e 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; Grau III (GIII) – *Cumulus* presente, mas expandido, com ooplasma contraído, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcia, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino; Degenerado, vacuolizado ou fragmentado; Desnudos – totalmente descobertos pelas células do *cumulus* ou parte coberto por elas; atrésico – *cumulus oophorus* escuro ou presença de sinais de degeneração citoplasmática.

Após essa etapa, os oócitos selecionados foram colocados na transportadora e então levados até uma empresa terceirizada para a fertilização in vitro.



Figura 7. Equipamento para OPU, bomba de vácuo, equipamentos de coleta, guia para aspiração e ultrassom prontos para a aspiração de oócitos em fêmeas para procedimentos de produção de embriões *in vitro*.



Figura 8. OPU com auxílio do médico veterinário em fêmea bovina contida e anestesiada.



Figura 9. Laboratório montado para seleção e classificação de óocitos com os seguintes equipamentos: lupa, transportadora de óocitos, micropipeta, ponteiras, mesa aquecedora, placa de petri, tubo Falcon.

2.2.3. Transferência de embriões em tempo fixo

Os protocolos de TETF foram realizados em 3 manejos (Figura 10). No D0 foi inserido um implante de progesterona (P4; CIDR[®], Zoetis, Brasil) e aplicado 2 mg de de benzoato de estradiol (Gonadiol[®], Zoetis, Brasil) i.m. Já no D8, foi realizada a retirada do dispositivo e a injeção de de 0,6 mg de cipionato de estradiol (E.C.P. [®], Zoetis, Brasil) i.m., 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (Novormon[®], Zoetis, Brasil) i.m. e 12,5 mg de Dinoprost Trometamina (Lutalyse[®], Zoetis, Brasil) i.m.. No D17, etapa final, realizou-se a transferência do embrião.

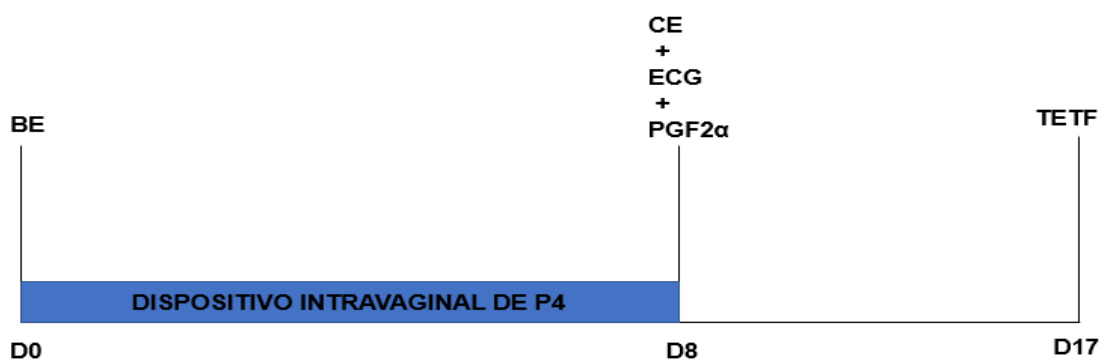


Figura 10. Protocolo de (TETF) com três manejos para sincronização de ovulação e realização da transferência de embrião (TE).

A produção *in vitro* dos embriões foi realizada por uma empresa terceirizada. Para a transferência, utilizou-se embriões a fresco. Todas as fêmeas foram avaliadas antes do procedimento pelo Médico Veterinário, com auxílio do aparelho de ultrassonografia (US), em que eram identificadas e selecionadas apenas as fêmeas que haviam CL para receberem o embrião. Dessas fêmeas aptas, avaliou-se o tamanho do corpo lúteo (CL) formado e em qual dos ovários estava presente. Os corpos lúteos foram classificados em grau 1 (CL menor), grau 2 (CL intermediário) e grau 3 (CL maior), podendo ser cavitários ou não cavitários. O embrião era depositado no corno uterino correspondente ao ovário com a presença de CL.



Figura 11. Transportadora contendo os embriões que foram transferidos a fresco em fêmeas bovinas previamente protocoladas e anotações referentes a TETF.

2.2.4. Diagnóstico gestacional

Os diagnósticos gestacionais (DGs) foram realizados com auxílio de US via retal (Figura 12). Os diagnósticos foram realizados por médicos veterinários, com média de 30 dias após a inseminação, onde os animais não gestantes foram ressyncronizados, a depender da propriedade. Algumas das fazendas não realizavam a ressyncronização, pois os animais vazios eram destinados ao repasse com touro. Em outra situação, em fazendas no Pantanal que apresentavam quantidade elevada

de animais, após 30 dias da IATF todos os animais eram destinados ao repasse, sem a realização do diagnóstico gestacional. Esse procedimento era realizado apenas ao término da estação de monta, quando todos os animais já haviam sido diagnosticados.



Figura 12. Diagnóstico gestacional realizado em fêmea bovina com auxílio do US após 30 dias do procedimento de IATF.

2.2.5. Exame andrológico

Os exames andrológicos foram realizados pelo médico veterinário responsável, para tal eram avaliadas as características físicas dos animais, perímetro escrotal, epidídimo e características dos testículos como: simetria, movimentação na bolsa escrotal e consistência. Após a palpação o sêmen do animal era coletado, utilizando a técnica de eletroejaculação. Então, a quantidade de semen ejaculado era avaliada, além de sua coloração e aspecto. Após essa etapa, uma parte do ejaculado era depositado em formol salina a 10%, com ajuda de uma micropipeta. Essa amostra era levada para avaliação de patologias espermáticas. No mesmo momento, era

depositada uma gota do conteúdo fresco em uma lâmina e, com ajuda de um microscópio, avaliava-se motilidade, vigor e turbilhonamento (Figura 14).



Figura 13. Mesa para realização do exame andrológico contendo os seguintes itens: microscópio, micropipeta, ponteiras, lâminas, fita de perímetro escrotal, caneta, lamínulas e computador para anotações.



Figura 14. Avaliação com o auxílio do microscópio de motilidade, vigor e turbilhonamento de sêmen bovino coletado a partir da técnica de eletroejaculação.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio obrigatório em medicina veterinária na área de Reprodução ofereceu a oportunidade de acompanhar outros profissionais da área e vivenciar a rotina de uma empresa focada na reprodução de bovinos. Foi uma experiência ímpar, pois se tornou o momento em que colocamos em prática todo conhecimento adquirido durante a graduação.

Conclui-se que a experiência prática na área em questão foi fundamental para a consolidação dos conhecimentos adquiridos durante a graduação. Além disso, traz valiosos ensinamentos que impactam tanto em minha vida profissional quanto pessoal. Foi muito gratificante contribuir para uma empresa respeitada no mercado, que enriqueceu minha formação. A oportunidade de aprender na prática, enfrentando desafios do dia a dia foi inestimável. Aprendi a lidar com pessoas e diversas situações, além de tomar decisões importantes em momentos críticos. Em resumo, essa experiência prática se mostrou extremamente enriquecedora em vários aspectos, tornando-me um profissional mais preparado.

4. CAPÍTULO 2. Sincronização da onda de crescimento folicular, na presença ou ausência de p4 com opu antes da divergência da onda.

Resumo: O uso das biotecnologias reprodutivas na pecuária de corte é de extrema importância para o avanço genético e produtivo do rebanho. A aspiração folicular e a transferência de embriões são ferramentas que aceleram esse processo. A busca por protocolos hormonais pré-OPU, destinados a melhorar a qualidade, quantidade e a conversão de oócitos, é um tema central de diversas pesquisas científicas. Pensando nisso, o presente estudo avaliou a sincronização da onda de crescimento folicular, na presença ou ausência de progesterona (P4) com *ovum-pick-up* (OPU) antes da divergência da onda. Foram utilizadas 25 fêmeas da raça Nelore com média de idade 23,76 meses. Os animais foram divididos em três grupos: O protocolo de indução foi realizado no D -22, utilizando o implante de P4 de 4º uso (CIDR®, zoetis, Brasil) e administrado 1,5 mg de benzoato de estradiol i.m. (Gonadiol®, Zoetis, Brasil) em todos os animais. No D -12 os implantes foram retirados e foi aplicado 1 mg de cipionato de estradiol i.m. (E.C.P®, Zoetis, Brasil). Posteriormente, no D -5, os animais foram selecionados de forma aleatória e o grupo PGF recebeu uma dose de 25 mg de Dinoprost Trometamina i.m. (Lutalyse®, zoetis, Brasil). O grupo PGFBE recebeu uma dose de 25 mg de dinoprost trometamina i.m. (Lutalyse®, zoetis, Brasil) e 1,5 mg de Benzoato de estradiol i.m. (Gonadiol®, Zoetis, Brasil). Já o grupo PGFBEP4 recebeu uma dose de 25 mg de dinoprost trometamina i.m. (Lutalyse®, zoetis, Brasil), 1,5 mg de Benzoato de estradiol i.m. (Gonadiol®, Zoetis, Brasil) e 150 mg de Progesterona injetável i.m. (Sincrogest®, Ourofino, Brasil). Todos os animais foram aspirados no D0. Não houve efeito de tratamento nas variáveis, concluindo não haver diferença na qualidade, quantidade e conversão de oócitos em relação a sincronização da onda de crescimento folicular, na presença ou ausência de p4 com opu antes da divergência da onda.

Palavras-chave: Progesterona; Sincronização; Oócitos; Aspiração.

4.2. INTRODUÇÃO

O uso das biotecnologias reprodutivas é fundamental para o desenvolvimento da pecuária moderna, sendo responsável pela produção de animais com características aprimoradas em termos de produtividade e qualidade. Técnicas como a aspiração folicular (OPU) e a transferência de embriões (TE) aliadas ao melhoramento genético, permitiram não apenas o aumento da produtividade, mas também a evolução das características genéticas desejáveis. Essas inovações têm contribuído para a criação de rebanhos mais eficientes e sustentáveis, com foco na maximização do potencial genético dos bovinos e na otimização dos recursos disponíveis. O avanço contínuo das biotecnologias reprodutivas e do melhoramento genético promete transformar ainda mais o setor, gerando impactos positivos tanto na economia quanto no bem-estar animal.

Do ponto de vista econômico, a reprodução é um dos principais focos da pecuária. Assim, a utilização de biotecnologias reprodutivas é uma alternativa para aumentar os índices zootécnicos de um rebanho bovino (RUBIN, 2006). Na última década, o Brasil passou por um crescimento significativo no segmento biotecnológico. Após um amplo e consolidado conhecimento sobre a obtenção de embriões *in vivo*, o país tornou-se dominante na produção *in vitro* de embriões (PIV), ocupando uma posição importante no mercado de embriões bovinos, sobretudo, por possuir o maior rebanho comercial do mundo e ser o principal exportador de carne bovina (SILVA et al., 2015).

A técnica de OPU orientada por ultrassonografia possibilita a recuperação de complexos *cumulus-oócitos* (COC) para a produção *in vitro* de embriões. Contudo, a qualidade dos oócitos recuperados e, conseqüentemente, seu potencial de desenvolvimento, dependem do status do crescimento folicular no momento da coleta (BÓ et al., 2004). Nos últimos anos, as fêmeas bovinas têm sido alvo de numerosas pesquisas visando um melhor aproveitamento de seus gametas, principalmente aquelas consideradas geneticamente superiores (SENEDA et al., 2002).

A indução da ciclicidade é um importante manejo a ser realizado antes da sincronização da onda folicular e, de acordo com Solorzano et al. (2004), 90% de vacas sincronizadas com implantes de progesterona novos ou reutilizados manifestaram sinais de estro após a retirada, quando associado à aplicação de

benzoato de estradiol. Azeredo et al. (2007) demonstraram que a progesterona, quando administrada em novilhas, principalmente as pré-púberes, foi capaz de iniciar a atividade estral.

Protocolos pré-aspiração foram desenvolvidos com o objetivo de controlar a onda de crescimento folicular. Dentre as formas de controle do crescimento folicular, o tratamento com progesterona e estradiol têm sido eficazes para promover a atresia dos folículos em desenvolvimento e a emergência de uma nova onda folicular 3 a 5 dias após, devido a ação inibitória destes dois hormônios sobre o FSH (BÓ et al., 1994, 2006). Naturalmente, o número de folículos disponíveis para a aspiração folicular apresenta considerável variação conforme a fase de crescimento folicular, sendo o início da onda o momento mais favorável para a recuperação, pelo maior número de folículos e pela melhor eficiência na captação dos oócitos a partir de folículos menores (SENEDA et al., 2001). Um outro aspecto importante refere-se à aplicação de PGF2 α previamente a aspiração, visando evitar a presença de corpo lúteo no momento da aspiração folicular, facilitando desta maneira a manipulação dos ovários (SENEDA et al., 2006)

Dessa forma, o presente estudo avaliou a sincronização da onda de crescimento folicular, na presença ou ausência de progesterona (P4) com (OPU) antes da divergência da onda, quanto a quantidade, qualidade e conversão de oócitos provenientes da OPU realizada antes da convergência da onda folicular.

4.3. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado em Pedro Juan Caballero na região de Lorito Picada, Amambay. Foram utilizados 25 novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*), com idade média de 23,76 meses, não gestantes e com média de escore corporal 2,76 (escala de 1 a 5) (LOWMAN; SCOTT; SOMERVILLE, 1976). Os animais foram mantidos em pastagem de *Brachiaria decumbens* com sal mineral e água à vontade.

4.3.2. Protocolos

As fêmeas foram submetidas a um procedimento de indução de ciclicidade (D-22; Figura 15) com a inserção de dispositivo intravaginal de progesterona de 4º uso

(CIDR®, zoetis, Brasil) e administração de 1,5 mg de Benzoato de Estradiol i.m. (Gonadiol®, Zoetis, Brasil). No D -12 foi removido o dispositivo e administrado 1 mg de Cipionato de Estradiol i.m. (E.C.P®, Zoetis, Brasil). No D -5, as fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em três tratamentos: 1) PGF (n = 9) – 25mg Dinoprost tetramina i.m. (Lutalyse®, zoetis, Brasil); 2) PGFBE (n = 7) – 25mg Dinoprost tetramina i.m. (Lutalyse®, zoetis, Brasil) e 1,5 mg Benzoato de Estradiol i.m. (Gonadiol®, zoetis, Brasil); 3) PGFBEP4 (n = 9) – 25mg Dinoprost tetramina i.m. (Lutalyse®, zoetis, Brasil), 1,5 mg Benzoato de Estradiol i.m. (Gonadiol®, zoetis, Brasil) e 150 mg de Progesterona injetável i.m. (Sincrogest®, Ourofino, Brasil). No D0 o procedimento de OPU foi aplicado em todos os animais.

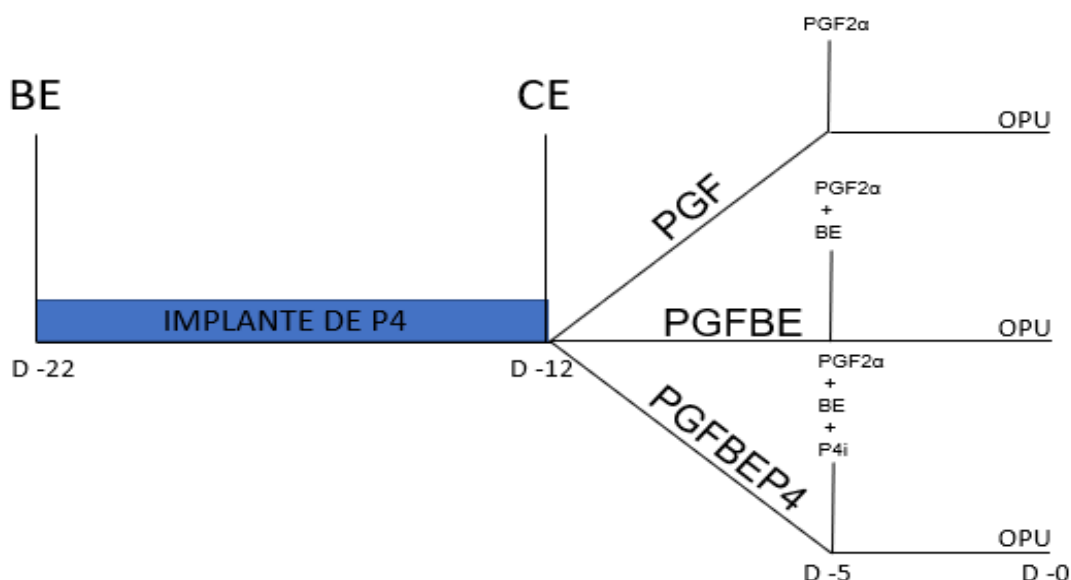


Figura 15. Esquema de protocolo experimental realizado em fêmeas Nelore divididas em três tratamentos de protocolos hormonais para avaliação de quantidade, qualidade e conversão de oócitos.

4.3.3. OPU

No D0 os animais foram devidamente imobilizados em um tronco de contenção com administração epidural de 100 mg de lidocaína (Lidovet®, Bravet, Brasil) para diminuir o peristaltismo e o desconforto da doadora. Foi utilizado o ultrassom da marca Chison, modelo ECO 3 expert, em tempo real, com transdutor microconvexo de 5 MHz, adaptado a uma guia para a aspiração folicular transvaginal. Para realização da punção folicular, foi utilizada agulha hipodérmica descartável (40x9 mm) comprimento, conectada a um tubo cônico de 50 ml por uma mangueira de silicone de 0,8 m e diâmetro interno de 2 mm. A aspiração foi realizada a partir de uma pressão negativa

correspondente à vazão de 99 mmHg, gerada por uma bomba de vácuo WTA, modelo BV-003D . O meio utilizado para aspiração foi soro fisiológico 0,9%.

Com o transdutor inserido na vagina e posicionado no fórnix, os folículos de ambos os ovários foram aspirados, independentemente do seu diâmetro. Para a obtenção dos oócitos, a agulha era pressionada contra a parede vaginal, introduzida até o ovário e então inserida nos folículos individualmente, no mesmo momento que a bomba de aspiração era ativada. Após a aspiração de todos os folículos, o sistema era lavado com o meio de punção e o material coletado encaminhado imediatamente para um laboratório montado em uma sala ao lado do curral. O fluido folicular recuperado era levado a um tubo Falcon de 50 ml com 5 ml de soro fisiológico 0,9%.

4.3.4. Classificação dos oócitos

A recuperação e avaliação dos oócitos foi realizada imediatamente após a aspiração dos mesmos. A classificação foi feita de acordo com as características das células do complexo *cumulus oophorus* (CCO) e do ooplasma: Grau I (GI) – Cumulus compacto presente, contendo mais de três camadas de células e Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom (ou presente mais do que três fileiras de células do cumulus); Grau II (GII) – Cumulus compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares e 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; Grau III (GIII) – Cumulus presente, mas expandido e Ooplasma contraído, com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcia, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino; Degenerado, vacuolizado ou fragmentado; Desnudos – totalmente descobertos pelas células do cumulus ou parte coberto por elas; atrésico – cumulus oophorus escuro ou presença de sinais de degeneração citoplasmática (SENEDA et al., 2001)

4.3.5. Fecundação *in vitro*

4.3.5.1. Maturação *in vitro* dos oócitos (MIV)

O processo durou 24 horas, sendo 3 horas de transporte nos criotubos e 21 horas no laboratório, em microgotas de 100 µL de meio de maturação, sob óleo mineral. Durante esse período, as microgotas permaneceram em incubadora com 5% de CO₂ em ar, à temperatura de 38,5°C e umidade relativa de 95%.

4.3.5.2. Fertilização *in vitro* dos oócitos (FIV)

Utilizou-se sêmen de acordo com a ordem de acasalamento previamente definida. O sêmen foi descongelado em água a 35-37°C por 30 segundos (palheta fina) e, em seguida, centrifugado por 30 minutos em gradiente (Percoll) para seleção e recuperação dos espermatozoides móveis. O sedimento selecionado pelo Percoll foi transferido para outro tubo Eppendorf. Após a lavagem, foi determinado o volume do sedimento, motilidade e vigor. O volume do sedimento foi ajustado para uma concentração final de 25×10^6 espermatozoides vivos/mL. Para a fecundação, 8 µL da suspensão de sêmen foram adicionados a cada gota de fecundação contendo os oócitos. Os espermatozoides e os oócitos foram incubados por 18 a 20 horas em atmosfera com 5% de CO₂, umidade relativa de 95% e temperatura de 38,5°C.

4.3.5.3. Cultivo *in vitro* dos embriões (CIV)

Após cerca de 20 horas de fecundação, os prováveis zigotos foram retirados das gotas de fecundação e colocados em meios próprios para o desenvolvimento. Após 48 horas, a placa foi retirada da incubadora e adicionado um novo meio de cultivo (Feeding) e avaliada a taxa de clivagem. A placa então foi colocada na incubadora. Os embriões permaneceram em incubação por 7 dias em atmosfera com 5% de CO₂, umidade relativa de 95% e temperatura de 38,5°C.

4.3.6. Análise estatística

As análises foram realizadas no SAS (SAS Institute, Cary, NC). O procedimento PROC MEANS forneceu médias e erros padrão das variáveis, enquanto PROC CORR avaliou as correlações entre estas. Para modelar a taxa de prenhez, produção lictária e de embriões, foi aplicado o PROC GLIMMIX com o tratamento como variável independente, fazendo como covariável, e testes de comparação múltipla foram realizados com LSMEANS e ajuste de Tukey. Além disso, a regressão logística foi feita com PROC LOGISTIC, gerando previsões de probabilidade e limites de confiança, visualizados com PROC SGPlot. Os resultados foram considerados significativos com $P < 0,05$.

4.4. RESULTADOS

No presente estudo, foram aspirados um total de 25 animais da raça nelore (*Bos indicus*) e divididos em três grupos de tratamentos hormonais. Após a OPU foram obtidos 588 Oócitos totais sendo 490 viáveis (Tabela 1).

Tabela 1. Número de oócitos totais e viáveis após OPU em doadoras Nelore

	Total
Oócitos totais	588
Oócitos viáveis	490

A hipótese de que a sincronização da onda folicular, com ou sem a presença de P4, previamente à OPU, aumentaria a quantidade e qualidade de oócitos viáveis e, portanto, a produção embrionária, não foi confirmada. Conforme os dados obtidos, o presente estudo não encontrou diferença entre os protocolos hormonais em relação ao número de oócitos recuperados, como mostra a (figura 16). Observa-se que a média de oócitos não diferiu entre os grupos PGF, PGFBE e PGFBEP4, respectivamente, ($P = 0,3827$).

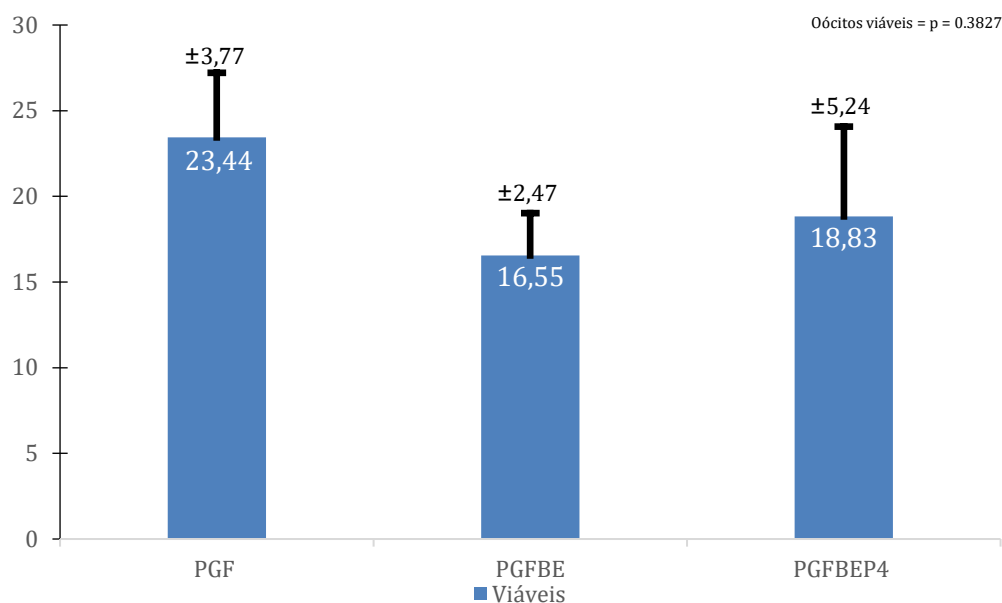


Figura 16. Média de oócitos viáveis dos 3 protocolos hormonais aplicados em fêmeas nelore, apresentando desvio padrão de cada amostra e P = 0,3827.

Como mostra a Tabela 2, nenhum efeito de protocolo foi encontrado em relação a quantidade de oócitos.

Tabela 2. número de oócitos G1, G2, G3, Citoplasma e sem *cumulos* obtidos após OPU em doadoras Nelore divididas em 3 protocolos hormonais para sincronização da onda de crescimento folicular com ou sem a presença de P4.

Classificação dos oócitos	Tratamentos			Valor P
	PGF (n= 9)	PGFBE (n=9)	PGFBEP4 (n= 7)	
GI	1,77 ± 0,59	1,66 ± 0,37	1,14 ± 0,55	0,8312
GII	4,77 ± 0,79	4,33 ± 0,94	3,85 ± 1,16	0,8704
GIII	14,66 ± 2,68	8,88 ± 1,49	11,57 ± 2,68	0,2804
Citoplasma	0,33 ± 0,33	0,11 ± 0,11	0 ± 0	0,3014
Sem <i>cumulus</i>	1,88 ± 0,61	1,55 ± 0,55	2 ± 0,72	0,8983

GI: Grau 1, GII: grau 2, GIII: Grau 3

Como mostra a figura 17, ao comparar o número de oócitos degenerados, verificou-se que o grupo PGFBEP4 ($5,57 \pm 1,04$) apresentou diferença ($P = 0,0098$) em relação ao grupo PGFBE ($2,55 \pm 0,55$).

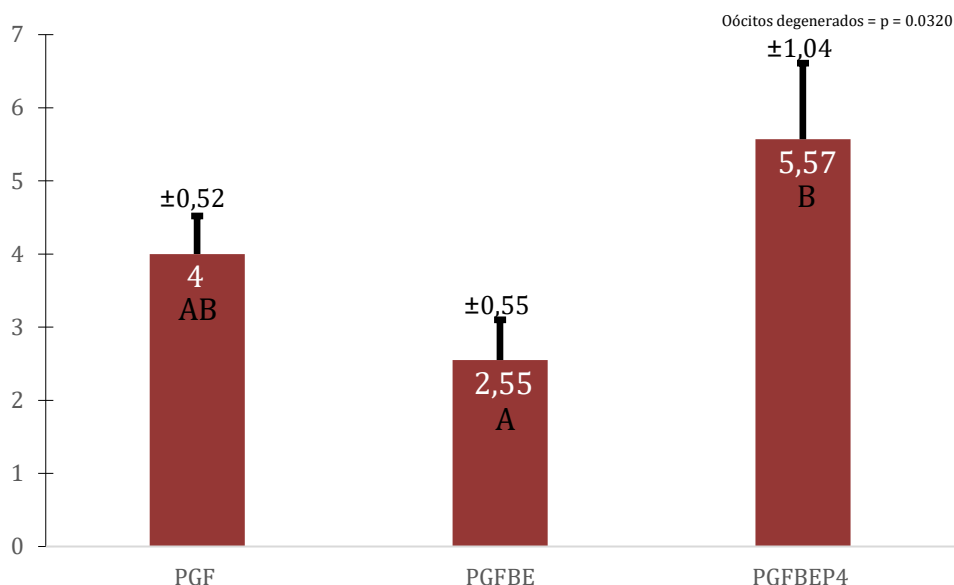


Figura 17. Média de oócitos degenerados dos 3 protocolos hormonais aplicados em fêmeas Nelore, apresentado desvio padrão e diferença estatística ($P = 0,0320$) entre os grupos PGFBE e PGFBEP4.

Não foi observado efeito dos protocolos aplicados em relação a quantidade de oócitos cultiváveis como demonstra a (Tabela 3).

Tabela 3. Número de oócitos viáveis, cultiváveis, clivados, clivagem, embriões e taxa de blastocisto após OPU - PIV em doadoras Nelore divididas em 3 protocolos hormonais para a sincronização da onda de crescimento folicular.

Item	Tratamentos			Valor P
	PGF (n= 9)	PGFBE (n=9)	PGFBEP4 (n= 6)	
Cultiváveis	23,44 ± 3,77	16,55 ± 2,47	18,83 ± 5,24	0,3827
Clivados	16,77 ± 3,44	11,66 ± 1,87	14,16 ± 4,89	0,5198
Taxa de clivagem	0,73 ± 0,08	0,72 ± 0,6	0,59 ± 0,15	0,5979
Embriões	6,22 ± 1,83	4,11 ± 1,07	4,16 ± 1,57	0,5344
Taxa de blastocisto	0,27 ± 0,08	0,24 ± 0,04	0,22 ± 0,05	0,8882

4.5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a influência de diferentes protocolos hormonais na sincronização da onda de crescimento folicular e sua relação com a recuperação, qualidade e conversão dos oócitos em vacas da raça Nelore. Os resultados indicam que os diferentes tratamentos hormonais aplicados não promoveram diferenças significativas quanto ao número total de oócitos recuperados, sua viabilidade, qualidade e conversão, conforme descrito nas tabelas e figuras do estudo. Esses

achados estão em concordância com outros estudos, como o de Correa (2015), que também não encontrou diferenças significativas quanto ao número de oócitos viáveis entre os animais que receberam tratamento com progesterona exógena em relação aos animais que não receberam progesterona.

Segundo FRATA (2021), a utilização de um protocolo hormonal baseado na administração de P4i, BE e PGF, para sincronização da onda pré-aspiração folicular, não repercutiu na melhora na quantidade de estruturas aspiradas e na eficiência da PIVE. Em geral, os benefícios da sincronização da onda folicular são questionáveis.

No entanto, uma diferença significativa foi observada na quantidade de oócitos degenerados entre os grupos PGFBE e PGFBEP4, com o grupo PGFBEP4 apresentando uma maior quantidade de oócitos degenerados, o que sugere que a presença de P4 no protocolo pode afetar negativamente a qualidade oocitária em relação aos protocolos que não utilizam o hormônio.

Como sugerido no estudo de BACELAR et al. (2010), o uso de P4i representa uma alternativa aos implantes de P4, que podem causar algum grau de irritação vaginal, aumentando a produção de muco que, quando aspirado, pode obstruir o sistema de aspiração. Porém, a utilização de P4i para sincronização da onda pré-aspiração folicular não repercutiu na melhora na quantidade de estruturas aspiradas (Frata et al, 2021).

É importante ressaltar que o sucesso das técnicas de produção *in vivo* e *in vitro* de embriões depende de diversos fatores ligados ao animal (raça, idade, paridade, lactação, população folicular e histórico reprodutivo), o manejo (nutrição, método de sincronização, gonadotrofina e sêmen) e ambiente (clima, estação e sistema de manejo), não somente a técnica e método utilizado (Mikkola et al, 2020).

Fatores como a condição corporal dos animais, segundo Dominguez (1995) e Lopez Ruiz et al. (1996), estão relacionados à produção reduzida de oócitos de boa qualidade em animais com baixa condição corporal e podem ter influenciado os resultados do estudo, uma vez que a média de escore dos animais foi de 2,76. Além disso, as condições ambientais, como a baixa prevalência de chuvas na região, podem ter afetado tanto a quantidade quanto a qualidade dos oócitos, sendo necessário considerar esses aspectos em futuras pesquisas. Embora o tratamento hormonal tenha sido eficaz na sincronização da onda folicular, os resultados não demonstraram uma melhora substancial na quantidade, qualidade e conversão de oócitos, o que

reforça a complexidade da interação entre os protocolos hormonais e a eficiência da produção de embriões.

Portanto, os resultados do presente estudo sugerem que a sincronização da onda de crescimento folicular, na presença ou ausência de p4 com OPU antes da divergência da onda utilizando os protocolos hormonais testados, não trouxe benefícios significativos para a conversão, quantidade e qualidade dos oócitos recuperados, sendo necessária uma investigação mais aprofundada sobre os efeitos de diferentes combinações hormonais e o impacto de variáveis externas.

4.6. CONCLUSÃO

Diante do exposto, foi possível observar que a ausência de P4 com administração de estradiol diminui a quantidade de degenerados. Porém, os tratamentos não influenciaram na quantidade, qualidade e conversão de oócitos. Vale ressaltar que, possivelmente, o tamanho limitado da amostra e a participação dos animais em apenas um grupo de protocolo hormonal influenciou nos resultados.

4.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- SENEDA MM, ESPER CR, GARCIA JM, ANDRADE ER. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura [Technical and biological aspects of obtaining bovine oocytes: a literature review]. **Semina: Ciências Agrárias**. 2002;23(1):101-10.
- SILVA, J. S.; BORGES, L. S.; LEITE LEÃO MARTINS, L. E.; ALVES DE LIMA, L.; DA SILVA BARBOSA, Y. G.; ARAÚJO DA SILVA, N.; DE PAIVA BRITO, T. K. Aspectos comerciais da transferência de embriões e fertilização in vitro em bovinos: revisão. **Nutri Time**, v. 12, n. 5, p.4316-4319, 1-10, set./out. 2015.
- BÓ G.A., MORENO D., CUTAIA L., BARUSELLI P.S., REIS, E.L. 2004. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, 32 (Supl): p.1-22.
- BÓ, G. A.; COLAZO, M. G.; MARTÍNEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Sincronización de la emergencia de la onda folicular y la ovulación en animales tratados con progestágenos y diferentes ésteres de estradiol. In: **SIMPÓSIO**

INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., 2006, Londrina. Anais... Londrina: Ed. UEL, 2006. p. 71-84.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; TRIBULO, H. E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1555–1569, 1994

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; OLIVEIRA, J. A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, n. 1-2, p. 37-43, 2001.

SENEDA, M. M.; SANTOS, G. M. G.; SILVA, K. C. F.; SPEGIORIN, M. R.; BLASCHI, W.; PONTES, J. H. F. Situação atual da aspiração folicular e da fecundação in vitro. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA**, 2., 2006, Londrina. Anais... Londrina: Ed. da UEL, 2006. p. 172- 180.

RUBIN, K. C. P. Particularidades reprodutivas da raça nelore na produção in vitro de embriões (PIVE). 2006. 64 f. Monografia (Especialização em Ciência Animal) - **Universidade Estadual de Londrina, Londrina**, 2006.

AZEREDO, D.M.; ROCHA, D.C.; JOBIM, M.I.M.; MATTOS, R.C.; GREGORY, R.M. Efeito da sincronização e da indução de estros em novilhas sobre a prenhez e o índice de repetição de crias na segunda estação reprodutiva. **C. Rur.**, v. 37, n. 1, 2007.

SOLOZANO, C. W. Pregnancy rates after estrus synchronization treatment with new and reused CIDR-B devices. **Rep. Fert Devel**, v. 16, n. 2, p. 214, 2004.

DOMINGUEZ, M. M. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. **Theriogenology**, v. 43, n. 8, p. 1405-1418, 1995.

LOPEZ RUIZ, L.; ALVAREZ, N.; NUNEZ, I.; MONTES, I.; SOLANO, R.; FUENTES, D.; PEDROSO, R.; PALMA, G. A.; BREM, G. Effect of body condition on the developmental competence of IVM/IVF bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, n. 1-2, p. 292, 1996. Abstract.

CORREA, R.F. *Efeitos da progesterona exógena na produção in vitro de embriões em novilhas Nelore pré-púberes*. 2015. 63 f. Tese (Doutorado) – **Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal**, 2015.

MIKKOLA, M., Factors affecting embryo production in superovulated Bos taurus cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.32, p.104–124. 2020.

FRATA, M.M. *Tratamentos hormonais e seus efeitos sobre a produção de embriões bovinos in vivo e in vitro*. Orientador: Bernardo Garziera Gasperin. 2021. 48 f. Tese (Mestrado) - **Universidade Federal de Pelotas**, 2021.

Lowman, BG, Scott, NA e Somerville, SH (1976) Condition Scoring of Cattle. East of Scotland College of Agriculture. Departamento de Produção, Aconselhamento e Desenvolvimento Animal Edimburgo: **Edinburgh School of Agriculture Bulletin**, No. 6.

BACELAR, D., Incremento na obtenção de oócitos em novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) tratadas com progesterona injetável e benzoato de estradiol. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, p.163-172. 2010. Disponível em: . Acesso em May 3, 2021. doi.