

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

**O CORPO LÚTEO EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES
BOVINAS: RELAÇÃO ENTRE MORFOLOGIA E
CONCEPÇÃO**

MARIA CLARA ALVES DOS SANTOS

Campo Grande – MS

2024

MARIA CLARA ALVES DOS SANTOS

**O CORPO LÚTEO EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES
BOVINAS: RELAÇÃO ENTRE MORFOLOGIA E
CONCEPÇÃO**

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

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Guerino Macedo

Campo Grande – MS

2024

MARIA CLARA ALVES DOS SANTOS

**O CORPO LÚTEO EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINAS:
RELAÇÃO ENTRE MORFOLOGIA E CONCEPÇÃO**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Guerino Macedo
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof.^a Dr.^a Eliane Vianna da Costa e Silva
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

M.V. Carlos Alberto Zanenga
Embriza Biotecnologia

Campo Grande, 19 de novembro de 2024

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família, em especial a minha mãe, Elza Alves, e pai, José Carlos dos Santos, que não mediram esforços para a realização do meu sonho, sempre me apoiaram e foram minha âncora. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela dádiva da vida, pela oportunidade de poder realizar mais um sonho, por sempre estar comigo e me guiar pelos caminhos certos, mesmo diante de todas as dificuldades.

Gratidão a minha família, meus pais, minha irmã Beatriz Alves, meu sobrinho Lorenzo Pavanelli, meus avós e a todos aqueles que se manteve em oração e torcendo para que eu chegasse até aqui.

Aos meus professores de graduação, em especial ao meu orientador Prof. Gustavo Guerino Macedo por todas as orientações, conselhos e contribuição para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, e a Prof^a Eliane Vianna da Costa e Silva, exemplo de mulher e inspiração profissional.

À minha melhor amiga de faculdade Maria Alice Mendes, por todo companheirismo, suporte e ombro amigo durante os anos de graduação. Também agradeço ao meu companheiro de vida, Douglas Vieira, por todo apoio e incentivo para a realização dos meus sonhos.

Ao projeto de ensino Concepção pela oportunidade de aperfeiçoamento teórico, prático e profissional na área de Reprodução Animal, e a todos os seus membros, pela amizade desenvolvida ao longo da trajetória acadêmica. Saibam que sempre torcerei pelo sucesso de cada um de vocês. Gratidão também aos técnicos do laboratório de Reprodução Animal da UFMS, Graziela e Luiz, pela amizade, conselhos e ensinamentos.

Agradeço a empresa Embriza Biotecnologia, em especial aos Médicos Veterinários Natali Zanenga e Carlos Zanenga por oferecer a oportunidade de estágio obrigatório, e a todos os seus profissionais, em especial as Médicas Veterinárias do laboratório, sempre muito receptivos e dispostos a ensinar. Aos profissionais de campo da MS Embryo Soluções em Pecuária, por auxiliar na coleta de dados para elaboração do meu experimento de trabalho de conclusão de curso.

Meu muito obrigada a todos, que de alguma forma fizeram parte e torceram para a realização deste sonho.

SUMÁRIO

I – Relatório de Estágio Obrigatório	7
1. INTRODUÇÃO	7
2. LOCAL DO ESTÁGIO	8
3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	11
3.1. Aspiração folicular (OPU -Ovum pick up)	12
3.2. Lavagem e seleção dos oócitos	14
3.3. Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	20
3.3.1. Preparação do meio e placas	21
3.3.2. Preparação do sêmen	23
3.3.2.1. Gradiente de Percoll	23
3.3.2.2. Meio de capacitação (CAP)	25
3.3.3. Fertilização	26
3.4. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	26
3.4.1. Clivagem e feeding	27
3.4.2. Previsão de produção e classificação dos embriões	29
3.4.3. Contaminação de placas	31
3.5. Envase de embriões	33
3.6. Criopreservação de embriões	35
3.6.1. Vitrificação	36
3.6.2. Direct Transfer (DT)	38
3.7. Transferência de embriões	40
3.8. Lançamento de dados no sistema Multbovinos	41
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
II – Trabalho de Conclusão de Curso	45
1. REVISÃO DE LITERATURA	45
1.1. Histórico da transferência de embriões	45
1.2. Cenário da PIVE e TE no Brasil	47
1.3. Seleção das receptoras	49
1.4. Corpo lúteo	50
1.4.1. Luteogênese	50
1.4.2. Produção de progesterona	52
1.4.3. Corpo lúteo cavitário	53

2. INTRODUÇÃO	54
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.4. Animais e manejo reprodutivo.....	55
3.5. Classificação morfológica dos embriões	55
3.6. Exames clínicos e ultrassonográficos	56
3.7. Medições do corpo lúteo	56
3.8. Procedimento de transferência de embriões	57
3.9. Diagnóstico de gestação	57
3.10. Análise estatística.....	58
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5. CONCLUSÃO	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

I – Relatório de Estágio Obrigatório

1. INTRODUÇÃO

O Estágio Supervisionado Obrigatório de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) é uma atividade curricular de treinamento, aprimoramento técnico, científico e de relações humanas, visando à complementação do processo ensino-aprendizagem. O estágio tem como objetivo estimular a capacidade de análise crítica, proporcionar formação prática e possibilitar a aquisição de novas técnicas de trabalho por meio de exercícios e práticas supervisionadas.

Este estágio foi realizado na empresa Embriza Biotecnologia, na área de Reprodução Animal, mais especificadamente na Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE) bovinos, focando nas atividades laboratoriais e no acompanhamento dos manejos realizados em campo pelos profissionais da MS Embryo Soluções em Pecuária.

A PIVE é uma ferramenta eficaz para o melhoramento genético de bovinos, permitindo a disseminação de genética aprimorada e, conseqüentemente, o aumento da eficiência produtiva e reprodutiva (BARUSELLI et al., 2019). A técnica envolve a coleta de complexos cumulus-oócitos por aspiração folicular, seguida da maturação, fertilização e cultivo *in vitro* dos mesmos. Os embriões resultantes passam por essas etapas em meios específicos e em um ambiente laboratorial controlado, para posterior transferência a fresco para fêmeas receptoras aptas a conceber ou criopreservação (RIZOS et al., 2008).

O Brasil é referência mundial na aplicação dessa biotecnologia, com investimentos em pesquisas que visam melhorar a eficiência, viabilidade e disseminação desta prática entre diferentes produtores. A PIVE avançou consideravelmente, possibilitando um rápido melhoramento genético das populações de gado, maximizando os benefícios genéticos produtivos e elevando a qualidade do rebanho bovino brasileiro (BATISTELA et al., 2021).

Este relatório tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas durante o estágio mencionado, correspondente ao décimo semestre da graduação em Medicina Veterinária na UFMS.

2. LOCAL DO ESTÁGIO

A Embriza Biotecnologia localiza-se em Campo Grande – MS (Figura 1) e atua há 30 anos na prestação de serviços em reprodução bovina, incluindo laboratório de PIVE, exportação de bovinos e embriões congelados. Fundada em 1994 pelo Médico Veterinário Carlos Alberto Zanenga, a empresa inicialmente se dedicava à produção de embriões *in vivo* e, em 2003, passou a trabalhar com a produção *in vitro*, conquistando o mercado de fazendas em todo o Mato Grosso do Sul e expandindo suas atividades para outros estados e países, como Índia e Bolívia.



Figura 1. Fachada da empresa Embriza Biotecnologia.
Fonte: Google Maps, 2024.

A estrutura da empresa é composta por 2 sócios, 6 funcionários, incluindo Médicos Veterinários e administrativos, e 2 estagiários. A MS Embryo Soluções em Pecuária, responsável pelos trabalhos de campo, conta com 3 Médicos Veterinários e 3 técnicos. A Embriza possui um setor laboratorial subdividido em duas áreas: Área 1 (Figura 2), com sala de preparação de materiais (lavagem e autoclavagem), armazenamento e manipulação de botijões de nitrogênio; e Área 2 (Figura 3), onde são realizadas as etapas de produção *in vitro* de embriões.



Figura 2. Setores correspondentes a área 1. Sendo A) Sala de preparação de materiais, presença de autoclave, seladora, estufa de secagem, micro-ondas e pia; B) Sala de armazenamento de materiais, carregamento de transportadores de oócitos e embriões, geladeira com os meios utilizados no campo; C) Sala de botijões de nitrogênio para armazenamento e manipulação de sêmen e embrião criopreservados.



Figura 3. Setores correspondentes a área 2. Sendo A) Sala 1, composta por capela de fluxo laminar horizontal, lupa, pipetas, placa aquecedora, descongelador de sêmen, três incubadoras, geladeira, botijão de sêmen, duas centrífugas e cilindro de gás; B) Sala 2, também com capela de fluxo laminar horizontal, lupa, pipetas, placa aquecedora e duas incubadoras.

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

O Estágio Supervisionado Obrigatório do Curso de Medicina Veterinária da UFMS, orientado pelo professor Dr. Gustavo Guerino Macedo e supervisionado pela Médica Veterinária Natali Freire Zanenga Chacha (CRMV/MS 03688), foi realizado no Laboratório Embriza Biotecnologia, no período de 05 de agosto a 1 de novembro de 2024, perfazendo um total de 460 horas. Durante este período, foi possível acompanhar a rotina laboratorial de produção de embriões *in vitro* e as atividades de campo da empresa MS Embryo Soluções em Pecuária.

O laboratório opera conforme a demanda de produção *in vitro* de embriões, respeitando os horários estabelecidos para cada etapa do processo (Figura 4). Diversas atividades foram desenvolvidas tanto no laboratório quanto em campo. As atividades no laboratório incluíram o acompanhamento de todas as etapas da produção, como maturação, preparação do sêmen, fertilização, cultivo, clivagem, *feeding*, envase dos embriões, vitrificação e transferência direta (DT), além da manipulação de botijões de nitrogênio com sêmen e embriões criopreservados e o lançamento das atividades no sistema Multibovinos. No campo, foram monitorados os manejos de aspiração folicular, seleção de oócitos e transferência de embriões (Tabela 1).

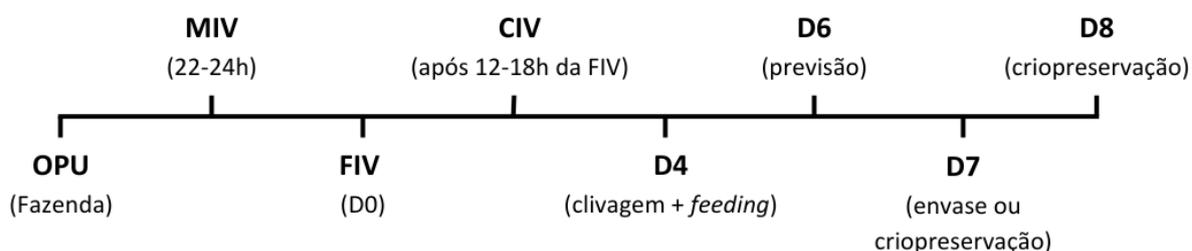


Figura 4. Esquema simplificado das etapas da PIVE. OPU (*Ovum pick up*), MIV (maturação *in vitro*), FIV (fertilização *in vitro*).

Tabela 1. Relação do número de atividades acompanhadas ou desenvolvidas durante o estágio obrigatório.

ATIVIDADE	QUANTIDADE
Preparação dos tubos de MIV	27
OPU + seleção de oócitos + MIV	3
FIV	62
CIV	7
D4	15
D6	17
Envase	7
Vitrificação	25
DT	3
TE	8
Total	174

MIV: maturação *in vitro*; OPU: aspiração folicular; FIV: fertilização *in vitro*; CIV: cultivo *in vitro*; D4: clivagem e *feeding*; D6: previsão de produção; TE: transferência de embriões; DT: *Direct Transfer*.

3.1. Aspiração folicular (OPU -*Ovum pick up*)

A OPU é um método de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom, que permite a recuperação de oócitos de animais vivos, possibilitando a produção de embriões de fêmeas em diferentes idades e estágios fisiológicos. Os benefícios dessa técnica incluem a não interferência no estado fisiológico do animal, a ausência de necessidade de estimulação hormonal exógena, menos invasiva em relação à coleta cirúrgica via laparotomia, e a possibilidade de realizar sessões de aspiração folicular a cada 15 dias ou mensalmente (VARAGO et al., 2008).

Durante o estágio, foi acompanhada a técnica. Inicialmente, todos os materiais utilizados, como ultrassom, guia de aspiração, bomba de vácuo, agulhas descartáveis (20G), e isopor com água a 37°C, foram organizados para a manutenção dos tubos Falcon. O meio utilizado para aspiração e lavagem da agulha é preparado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de heparina para cada litro de solução fisiológica, acompanhada de antibiótico (amicacina).

Um ponto crucial a ser ajustado é a pressão negativa do sistema, gerada pela bomba de vácuo, pois esta afeta a recuperação e a qualidade dos complexos cumulus-oócitos (CCOs). Pressões elevadas podem danificar os oócitos, resultando em perda das células do cumulus e ruptura da zona pelúcida, enquanto pressões muito baixas dificultam a recuperação e favorecem a adesão das estruturas e a formação de coágulos (OLIVEIRA et al., 2014). A pressão utilizada pelos profissionais acompanhados variou de 18 a 20 mL/min.

Após o preparo dos materiais, as fêmeas doadoras são contidas em um tronco de contenção, seguido da anestesia epidural no espaço sacrococcígeo com 2 a 4 ml de Lidocaína 2% para reduzir os movimentos peristálticos e evitar traumas durante a manipulação. Em seguida, a guia de aspiração transvaginal é inserida até o fundo vaginal, e os ovários são devidamente posicionados por palpação retal, permitindo a visualização dos folículos na tela do ultrassom com auxílio do transdutor microconvexo (Figura 5). A agulha é pressionada contra a parede vaginal, sendo introduzida até o ovário para inserir-se nos folículos no momento em que o pedal da bomba de vácuo é ativado, permitindo a aspiração de todos os folículos visíveis.

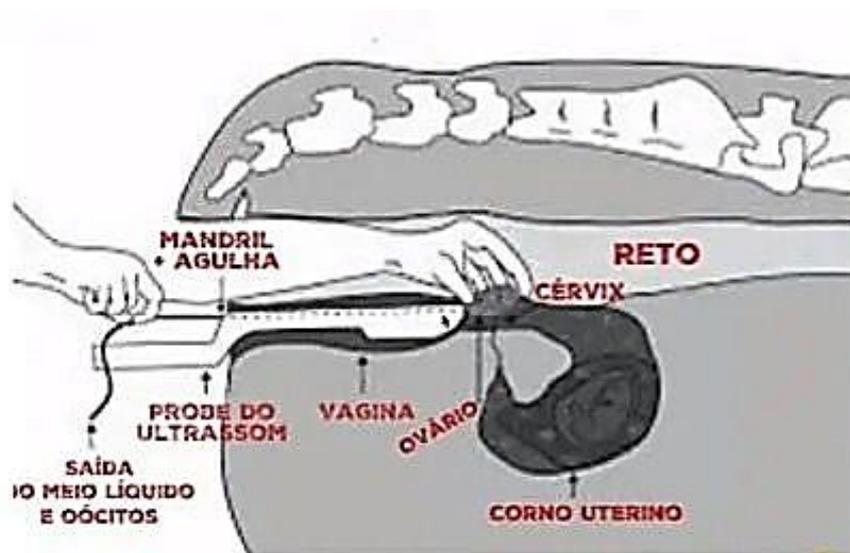


Figura 5. Ilustração da aspiração folicular guiada por ultrassom.
Fonte: Adaptado Rehagro, 2024.

3.2. Lavagem e seleção dos oócitos

Após a aspiração, o tubo contendo os oócitos é direcionado para um local devidamente preparado para realização dos procedimentos. Inicialmente, o fluido folicular é submetido à lavagem e filtração, com auxílio de filtro apropriado, capaz de reter os complexos *cumulus* oócitos (CCO) que, posteriormente, são transferidos para placa de petri, onde serão rastreados com auxílio do estereomicroscópio (Figura 7). As estruturas encontradas são transferidas para outra placa contendo três gotas de meio de lavagem (LAV), este meio já é adquirido finalizado, sendo necessário realizar, no laboratório, apenas o cálculo de estimativa da quantidade necessária de acordo com o número de doadoras e transferi-lo para tubos de 5 ml, onde cada tubo é o suficiente para 10 animais.

Durante o estágio foi possível observar que todas as estruturas presentes (oócitos viáveis, sem *cumulus* e atrésicos/degenerados) eram destinadas para a etapa de maturação. Como justificativa, seria a possibilidade de erros de classificação, evitando o descarte de estruturas com potencial para desenvolvimento. Outro ponto importante, é que a classificação baseada em características do *cumulus* e do citoplasma do oócito, como descrito na Tabela 2 e ilustrado na figura 6, em graus de I a IV, não era mais realizada pelos técnicos de campo, visto que todas as estruturas eram enviadas para o laboratório como citado anteriormente. Tal classificação apresenta grande relevância, visto que, de acordo com Gonçalves et al. (2002), o potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário, é estimado por estas características de seleção do CCO.

3.3. Transporte e Maturação *in vitro* (MIV)

A preparação dos materiais necessários para a MIV começa no laboratório, onde os tubos de 5ml são previamente preparados com 500 µL de meio MIV e 250 µL de óleo mineral (Figura 9), responsável por impedir a evaporação do meio e facilitar a rápida absorção de hormônios esteroides, todos gaseificados, lacrados e armazenados sob refrigeração até serem transportados para o local da aspiração no transportador de oócitos para estabilização da temperatura em 38°C.

Na MIV os tubos são gaseificados com baixa tensão, ou seja, 5% de CO₂ e 5% de O₂ mais N₂ balanço (Figura 8). O CO₂ é utilizado para controlar o potencial de hidrogênio (pH) dos meios tamponados com bicarbonato. A tensão de O₂ mimetiza o encontrado no fluido folicular e na tuba uterina (1,5 a 8,5%), que é menor quando comparado ao ar atmosférico (20%) (BAVISTER, 1995).

Quadro 1. Classificação morfológica dos oócitos recuperados.

Classificação	Descrição
Grau I	Oócitos com mais de três camadas de células compactas do <i>cumulus</i> , e citoplasma regular.
Grau II	Oócitos com uma a três camadas de células do <i>cumulus</i> , citoplasma regular ou apresentando granulações finas.
Grau III	Oócitos apresentando menos de três camadas do <i>cumulus</i> ou parcialmente desnudos, citoplasma irregular.
Grau IV	Desnudos (oócitos sem células do <i>cumulus</i>) ou em degeneração (com <i>cumulus</i> expandido e citoplasma heterogêneo apresentando granulações severas).

Fonte: Adaptado Oliveira et al., 2014.

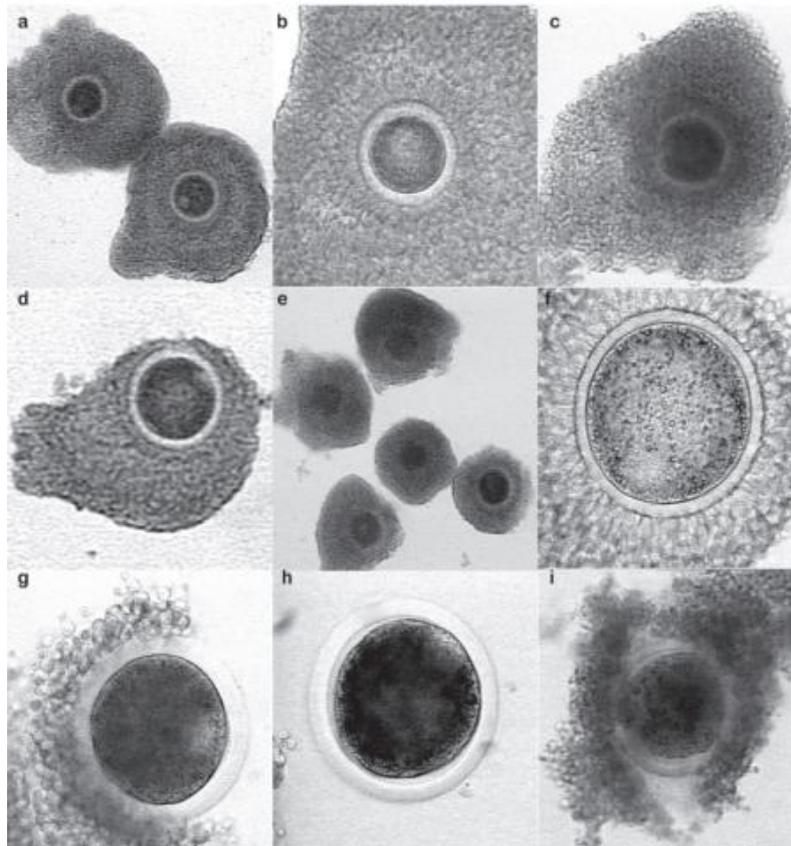


Figura 6. Complexos cumulus-oócito bovinos. Grau I (a,b,c,e), grau II (d,f), grau III (g) e grau IV (h,i)
Fonte: Biotécnicas da Reprodução em Bovinos, 2014.

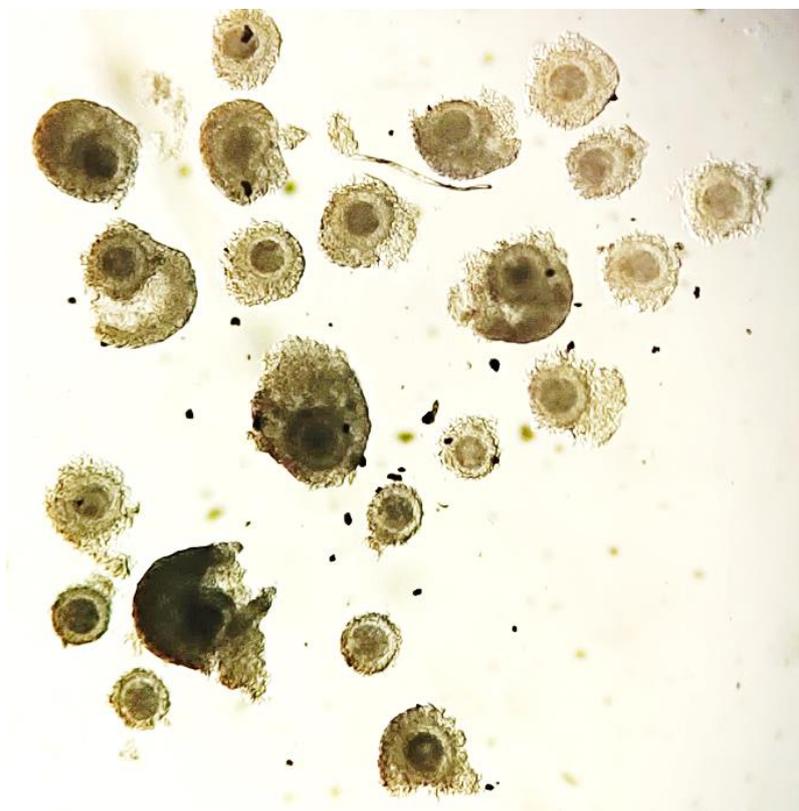


Figura 7. Complexos *cumulus*-oócito de bovino.

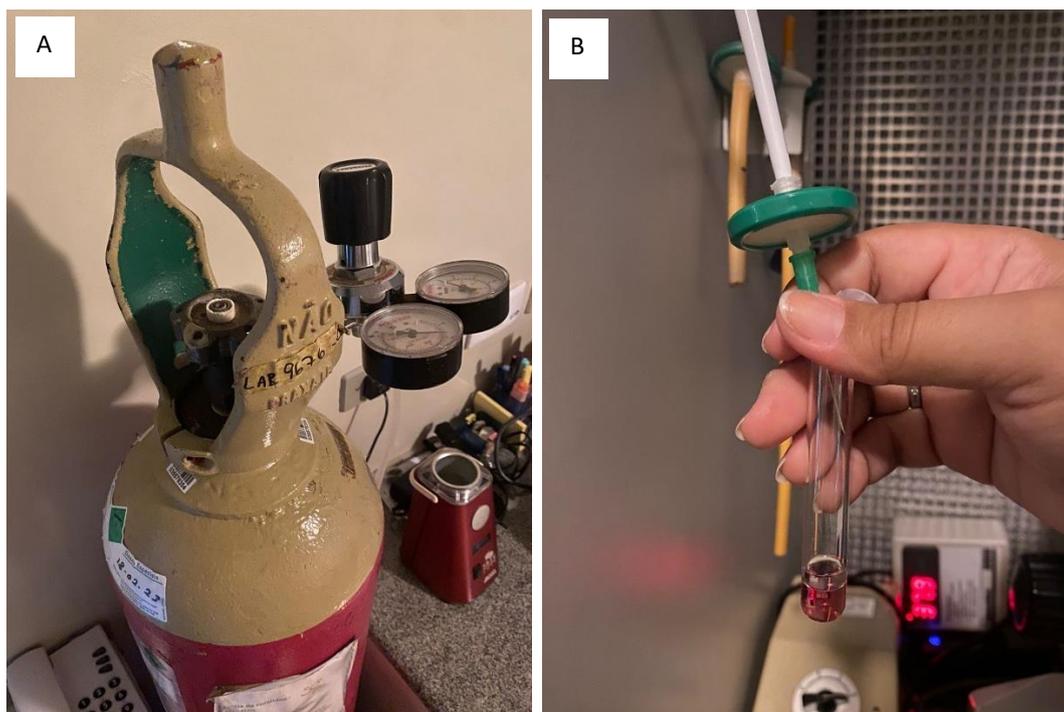


Figura 8. Etapa de gaseificação dos tubos com meio MIV. A) Cilindro de gás do laboratório Embriza; B) Gaseificando o tubo.

O meio MIV utilizado pelo laboratório Embriza é adquirido finalizado e pronto para utilização. De acordo com Albertini (2013), este meio é composto por gonadotrofinas (FSH e LH) que simulam o ambiente folicular pré-ovulação, para influenciar a expansão de células do *cumulus* e a maturação nuclear, através da ativação de AMPc e outros mensageiros intracelulares. Um exemplo quanto a formulação seria: Tissue Culture Medium 199 (TCM199®) com sais de Earle suplementado com l-glutamina, antibiótico (penicilina e estreptomicina), bicarbonato de sódio, piruvato de sódio, hormônios (FSH, LH e estradiol) e soro fetal bovino (OLIVEIRA et al., 2014).

Após a seleção, os oócitos são transferidos para os tubos ainda no campo, sendo que cada tubo corresponde a uma doadora e comporta até 50 estruturas, em casos de doadoras de produção superior a este número, os oócitos são divididos em mais tubos conforme a necessidade. Em seguida os tubos são gaseificados novamente e direcionados para o transportador de oócitos com temperatura controlada em 38°C, onde permanecerão por 22-24h, para posterior realização da fertilização *in vitro* no laboratório (Figura 10).

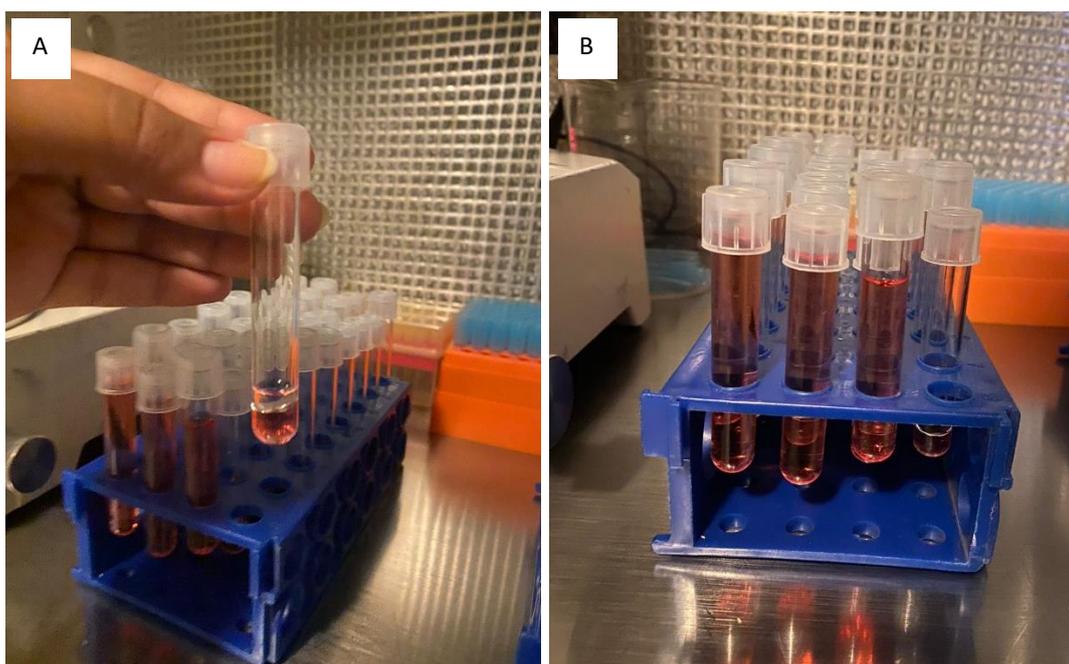


Figura 9. A) Tubo de MIV pronto e devidamente fechado; B) Raque com os tubos contendo LAV a frente, e MIV ao fundo.



Figura 10. Transportador de óocitos com os tubos de MIV com as estruturas.

A maturação dos oócitos envolve uma série de transformações nucleares, citoplasmáticas e moleculares que tornam o gameta feminino apto a ser fecundado (SMITZ et al., 2004). A maturação nuclear (Figura 11; 12) inicia imediatamente após a retirada do oócito do ambiente folicular com interrupção do contato com as células foliculares, ocorre sem influência das células do *cumulus* e é caracterizada pela ruptura da vesícula germinativa, que compreende os processos de condensação da cromatina e dissolução da membrana nuclear (VARAGO et al., 2008). Nesta etapa, o oócito que se encontrava no estágio de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica passa para o estágio de metáfase II. O citoplasma também sofre alterações na modulação da síntese de proteínas e reorganização de organelas citoplasmáticas, como redução do tamanho do Complexo de Golgi, aumento gradativo de lipídeos, compactação do nucléolo e alinhamento dos grânulos corticais próximos à membrana do oócito (FERREIRA et al., 2009).

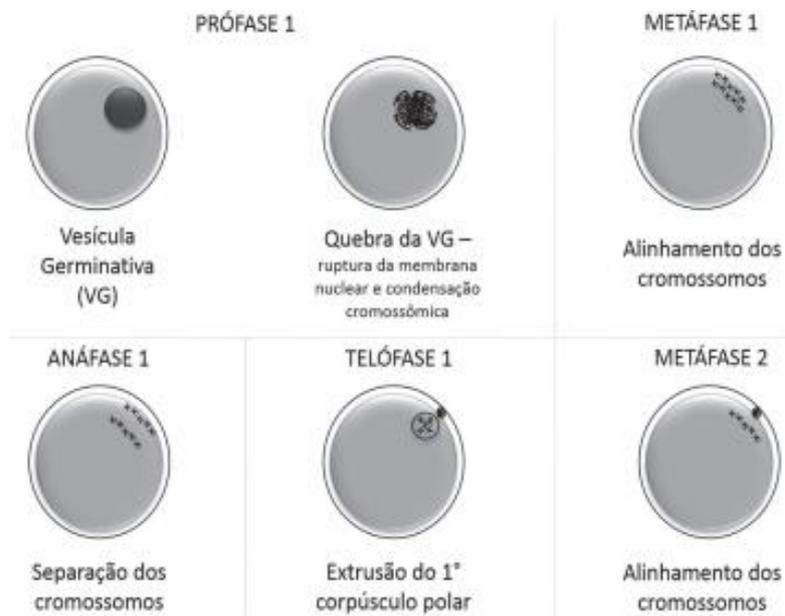


Figura 11. Etapas de maturação nuclear de oócitos bovinos.

Fonte: Oliveira et al., 2014.



Figura 12. Oócitos maturados de bovinos após cultura realizada no Laboratório da Embriza Biotecnologia Ltda.

3.3. Fertilização *in vitro* (FIV)

A FIV ocorre através da incubação de oócitos maduros com espermatozoides capacitados, em meio de fecundação, onde, após a fusão das membranas e o emparelhamento dos pró - núcleos feminino e masculino, origina - se o zigoto (OLIVEIRA et al., 2014). Este processo é composto por várias etapas, como ilustrado na Figura 13.

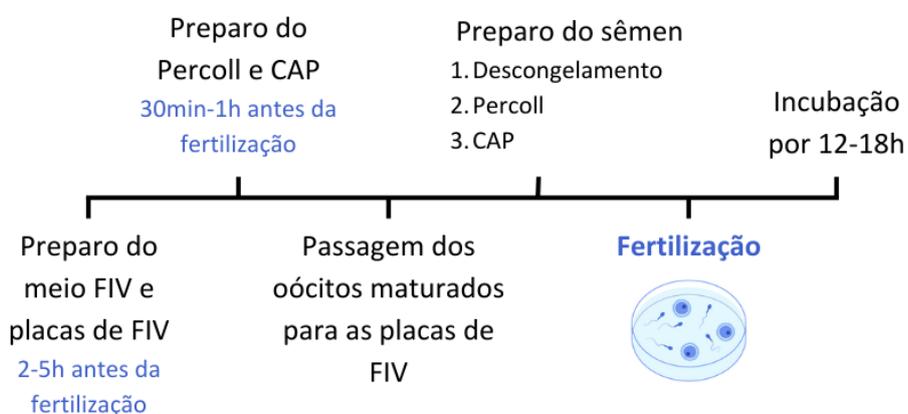


Figura 13. Esquema simplificado das etapas da FIV.

3.3.1. Preparação do meio e placas

O meio base da FIV utilizado no laboratório Embriza também é adquirido pronto, porém este é o único que precisa ser finalizado no laboratório. A finalização se dá por meio do acréscimo de heparina e PHE (penicilina, hipotaurina e epinefrina). A adição de epinefrina e hipotaurina têm a função de melhorar o ambiente embrionário, possibilitando a estabilização do pH, proteção contra o estresse oxidativo, promoção do desenvolvimento e melhora da viabilidade embrionária (MILLER et al., 1994). A heparina é uma glicosaminoglicana que desencadeia reações bioquímicas na membrana plasmática do espermatozoide agindo como um agente capacitante, assim como o cálcio ionóforo, que também faz parte da composição do meio FIV (ASSUMPÇÃO et al., 2002), juntamente com a albumina sérica bovina.

As placas de FIV são preparadas entre 2 a 5 horas antes do procedimento e colocadas na incubadora, juntamente com o meio FIV, para estabilização. As incubadoras utilizadas a partir desta etapa possuem atmosfera controlada com alta tensão (5% de CO₂, 20% de O₂ e N₂), umidade saturada e com temperatura controlada em torno de 39°C (Figura 14).

Em casos de fertilização com sêmen convencional, as placas são compostas por três camadas, primeiramente as gotas (máximo de 4 por placa) de 50 µL de meio FIV cada, seguido de 4 ml de óleo mineral e outra camada sobre as gotas anteriores de 50 µL de meio FIV novamente. Já em sêmen sexado, as placas são compostas apenas pelas duas primeiras camadas (meio e óleo mineral).



Figura 14. A) Preparação das placas de FIV com o meio e óleo; B) Meio FIV estabilizando na incubadora; C) Placas de FIV estabilizando na incubadora.

Após estabilização, é realizada a transferência das estruturas maturadas para a placa de FIV anteriormente preparada. Inicialmente, os oócitos passam por um processo de lavagem em três gotas no meio FIV, para depois serem depositados nas gotas adjacentes presente nas placas. Em cada gota de meio FIV são depositados no máximo 30 oócitos, sendo que, quando a doadora obtiver produção superior, as estruturas são distribuídas em outras gotas conforme a necessidade.

3.3.2. Preparação do sêmen

As doses de sêmen criopreservadas utilizadas para fertilização são descongelados por 30 segundos em água aquecida a 37°C. Posteriormente, é necessário selecionar os espermatozoides vivos e capazes de fecundar, por meio do gradiente de Percoll e a solução capacitação (CAP).

3.3.2.1. Gradiente de Percoll

Este procedimento tem como propósito selecionar os espermatozoides de acordo com a maturidade dos mesmos e integridade de células, remover diluentes, plasma seminal e bactérias através da centrifugação em gradiente de densidade de Percoll, composto por partículas de sílica coloidal coberto com polivinilpirrolidona (PVP). A montagem do Percoll acontece em gradientes de 90% e 45% (FERRÉ et al., 2020).

A solução é preparada entre 30 minutos a 1 hora antes da FIV para a estabilização do meio (na incubadora ou placa aquecedora) e é composta em duas camadas de 400 µL cada, sendo a primeira de percoll 90% e a outra de 45%, colocadas no eppendorf (1,6 ml) de modo que não se misturem (Figura 15;16). Posteriormente, o sêmen descongelado é depositado no eppendorf, sem que se misture com as camadas do percoll, e levado para a centrífuga, na qual, em caso de sêmen convencional, a rotação utilizada é de 3800 rpm por 5 min e, no sêmen sexado é utilizado 9000 rpm por 5 min. As diferenças de rotação são necessárias visto que o sêmen sexado apresenta características próprias, tais como baixa motilidade pós descongelamento (PALMA et al., 2008) e baixa taxa de blastocisto quando se comparado ao sêmen convencional (WILSON et al., 2006).



Figura 15. A) Estagiária Maria Clara preparando os eppendorfs com os meios Percoll e CAP; B) Raque com os eppendorfs finalizados.



Figura 16. Tubos de eppendorfs com Percoll (P) e CAP (C) estabilizando na placa aquecedora.

Após a centrifugação, a fração móvel dos espermatozoides se encontram no fundo do eppendorf (Figura 17), local onde será inserida a ponteira para pipetá-los e transferi-los para o meio CAP.



Figura 17. A) Eppendorff com meios Percoll e sêmen antes da centrifugação. B) Resultado após a centrifugação, deposição dos espermatozoides viáveis ao fundo.

3.3.2.2. Meio de capacitação (CAP)

O segundo processo é o de capacitação, o qual resulta na deposição dos espermatozoides no fundo do eppendorff com a formação do pellet. São colocados de 800 a 1000 μL de meio CAP no eppendorff, preparado juntamente com o percoll, respeitando o tempo necessário para a estabilização. Após a centrifugação no percoll os espermatozoides pipetados são depositados no meio CAP para, posteriormente, ser centrifugado novamente, sendo o convencional em uma rotação de 3800 rpm e o sexado em 9000 rpm, ambos por 3min. Após a centrifugação, o sobrenadante é removido ao máximo restando apenas o pellet formado pelos espermatozoides, que pode ser diluído com meio FIV dependendo da concentração obtida ao final do procedimento, geralmente a diluição só é necessária em sêmen convencional.

Vale destacar que a avaliação da concentração do sêmen no laboratório referido é realizada de forma subjetiva, apenas visual. De acordo com Oliveira et al., 2014, a dose inseminante varia de 5 a 10 μl de sêmen por gota, o que representa uma concentração de 100×10^3 espermatozoides por gota, correspondendo a 5×10^3 espermatozoide por oócito.

3.3.3. Fertilização

Esta etapa consiste na deposição dos espermatozoides nas gotas de FIV contendo os oócitos maturados (Figura 18). A fertilização é realizada no laboratório Embriza com 5 μL por gota de FIV em sêmen convencional, e 12 μL em sêmen sexado, podendo alterar os valores a partir da avaliação subjetiva na lupa.

Ao entrar em contato com o oócito, na presença de cálcio extracelular, o espermatozoide capacitado se liga aos receptores presentes na zona pelúcida e sofre a reação acrossômica, determinada pela fusão das membranas plasmática e acrossomal. O período de incubação dos oócitos com os espermatozoides adotado pelo laboratório é de 12 a 18 horas.

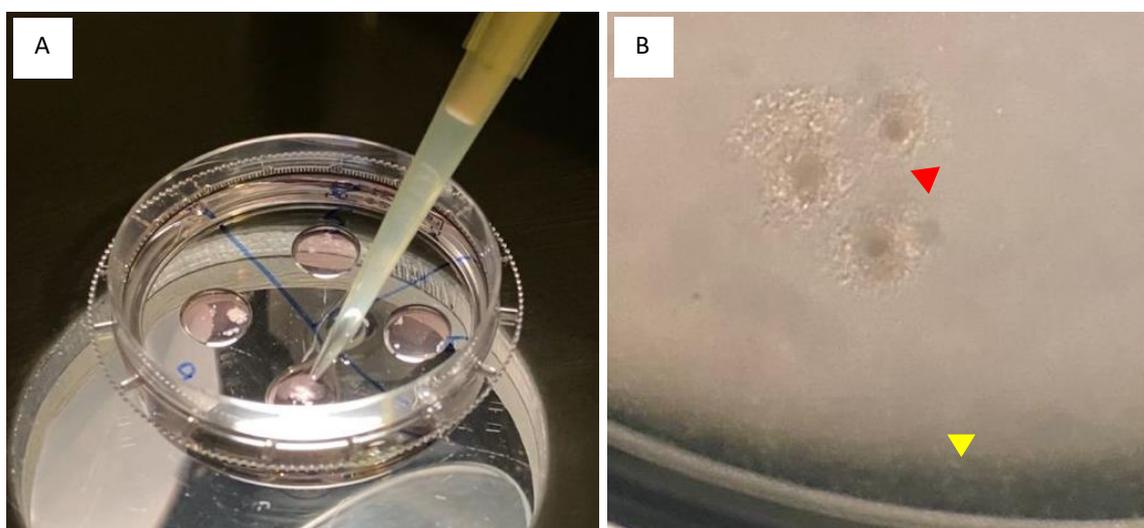


Figura 18. A) Momento da fertilização *in vitro* em uma gota da placa de FIV contendo os oócitos maturados. B) Seta vermelha: oócitos maturados; seta amarela: espermatozoides visíveis na borda da gota do meio FIV.

3.4. Cultivo *in vitro* (CIV)

Neste procedimento, os oócitos fertilizados são transferidos, após 12 a 18 horas na incubadora em meio FIV, para uma nova placa de petri contendo gotas de meio CIV. As placas são preparadas antecipadamente para a estabilização do meio na incubadora, sendo que, em caso de até três gotas é utilizado 150 μL /gota de meio CIV seguido de 4 ml de óleo mineral e, quando a placa é composta por quatro gotas, cada uma é constituída por 75 μL , uma camada de óleo mineral e mais quatro

gotas sobre as anteriores também de 75µL de meio CIV. Da mesma maneira que os meios citados anteriormente, o CIV também é adquirido pronto para uso, geralmente a base é composta de fluido ovidutal sintético suplementado com BSA, SFB, antibióticos, aminoácidos e piruvato de sódio (GIMENES et al., 2015)

No laboratório, todas as estruturas presentes nas placas de FIV são transferidas para as placas de CIV, onde permanecem por 7 dias na incubadora, sob as mesmas condições de controle da etapa anterior, para que todas as etapas de desenvolvimento embrionário ocorram. Diante disso, o cultivo *in vitro* é de extrema importância, pois é marcado por importantes eventos, como clivagem, ativação do genoma embrionário, compactação dos blastômeros, diferenciação do trofoblasto e embrioblasto, formação e expansão da blastocèle e rompimento da zona pelúcida (GONÇALVES et al., 2021).

3.4.1. Clivagem e *feeding*

Ambas as etapas são realizadas no dia 4 do cultivo no laboratório Embriza. Na clivagem, as estruturas presentes nas gotas são avaliadas quanto a divisão celular e, conseqüentemente, confirmação da fecundação. A partir disto, é realizada a separação de estruturas não fecundadas e sujidades (Figura 19), como debris celulares, que, posteriormente, são removidos da gota juntamente com o *feeding*, que consiste na retirada de 75µL do meio CIV seguido da adição de 75µL do mesmo meio novo, previamente estabilizado na incubadora (Figura 20). Esta etapa possui extrema importância para o desenvolvimento embrionário, visto que, estrutura não clivadas e sujidades podem resultar em um meio tóxico e interferir nas estruturas já em processo de desenvolvimento.

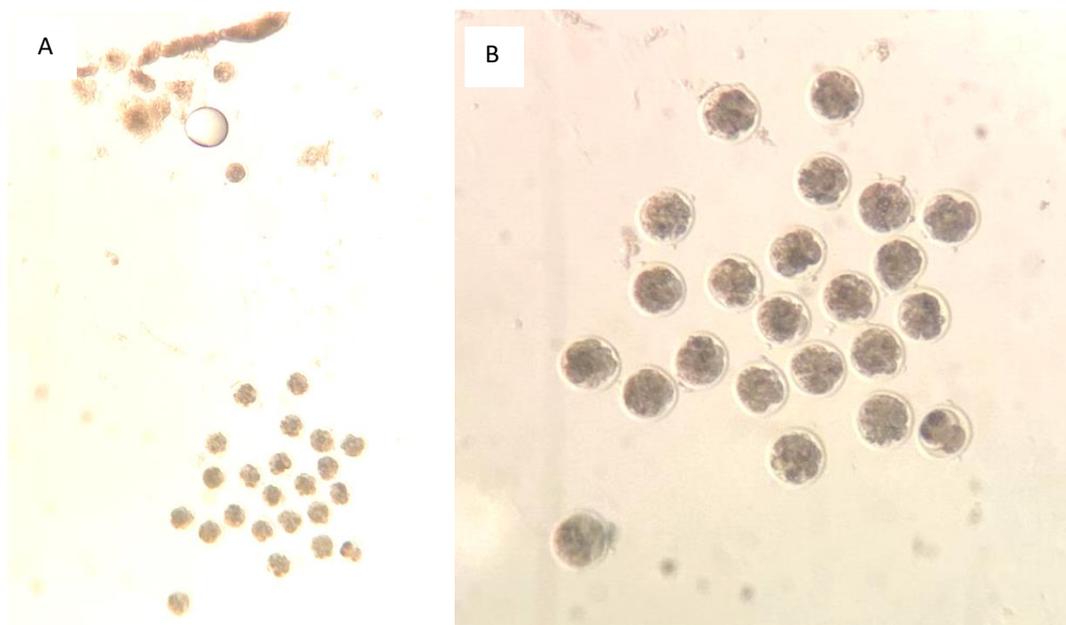


Figura 19. A) Sujidades e estruturas não clivadas na parte superior e clivadas na parte inferior; B) Estruturas clivadas em maior aumento.



Figura 20. A) Etapa de remoção das estruturas não clivadas, sujidades da placa e 75 μ L de meio CIV; B) Estagiária Maria Clara realizando o procedimento.

3.4.2. Previsão de produção e classificação dos embriões

Embriões cujo destino final seja a transferência a fresco, passam pelo processo de previsão de produção no dia 6 do cultivo. A previsão consiste na análise por meio da lupa de todas as placas de cultivo para a contagem de embriões produzidos até o momento, podendo ser blastocisto inicial, blastocisto ou blastocisto expandido. Com esta etapa, é possível atualizar o proprietário quanto o número produzido e auxiliar na tomada de decisões para a transferência no dia posterior. Lembrando que o número de embriões poderá aumentar, pois ainda ficarão algumas horas no cultivo até o momento do envase.

A classificação morfológica é uma ferramenta de extrema importância para a seleção dos embriões aptos à transferência e criopreservação. Segundo Viana (2009), durante esta etapa são consideradas características associadas à progressão do desenvolvimento embrionário, como número, tamanho e grau de compactação dos blastômeros (células embrionárias), formação da blastocele (cavidade embrionária), espaço ocupado pelo embrião e espessura da zona pelúcida (envoltório externo).

A Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) padronizou os critérios para a classificação morfológica de embriões bovinos. A classificação do estágio de desenvolvimento possui escala de 1 a 9, sendo 1 oócito não fecundado e 9 blastocisto eclodido (Figura 21). Existe também a classificação quanto à qualidade embrionária (figura 22) onde o código 1 caracteriza embriões de excelente e boa qualidade e o código 4 para embriões degenerados ou mortos (IETS, 1998).

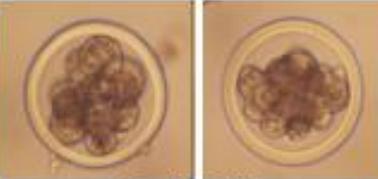
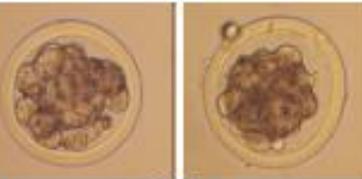
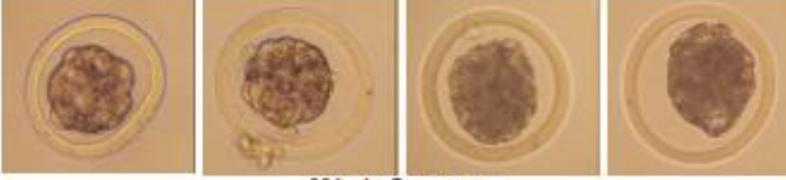
 <p>8 – 12 Células Código IETS: 2</p>	 <p>Mórula Código IETS: 3</p>	<p>Mórula Fase esperada: dias 5,5-6,0 do ciclo Características: Blastômeros ainda evidentes, porém não é mais possível determinar número exato. Massa de células ocupa maior parte do espaço dentro da zona pelúcida. Período caracterizado pelo fim da fase de celularização e da transição materno-zigótica e início do processo de compactação.</p>
 <p>Mórula Compacta Código IETS: 4</p>		<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 perivitelínico. Formação de junções de adesão e de oclusão entre as células, preparando o embrião para a formação da blastocela.</p>
 <p>Blastocisto Inicial Código IETS: 5</p>		<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 blastocela. Perda da totipotência, com a formação de duas populações celulares distintas: o trofoblasto, que reveste a blastocela, e a massa celular interna (MCI), lateral à blastocela.</p>
 <p>Blastocisto Código IETS: 6</p>		<p>Blastocisto Fase esperada: dias 7,0 a 7,5 do ciclo Características: Blastocela aumenta de tamanho, tornando-se proporcionalmente maior que a massa celular interna e ocupando gradualmente todo o espaço perivitelínico. Trofoblasto sofre diferenciações morfológicas e funcionais associadas à captação de nutrientes, enquanto as células da MCI mantêm potencialidade.</p>
 <p>Blastocisto Expandido Código IETS:</p>	 <p>Blastocisto Eclodido Código IETS: 8</p>	<p>Blastocisto Expandido Fase esperada: dias 7,5 a 8,0 do ciclo Características: Expansão da blastocela 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>

Figura 21. Classificação de embriões bovinos produzidos *in vivo* de acordo com o estágio de desenvolvimento

Fonte: Viana, 2009.

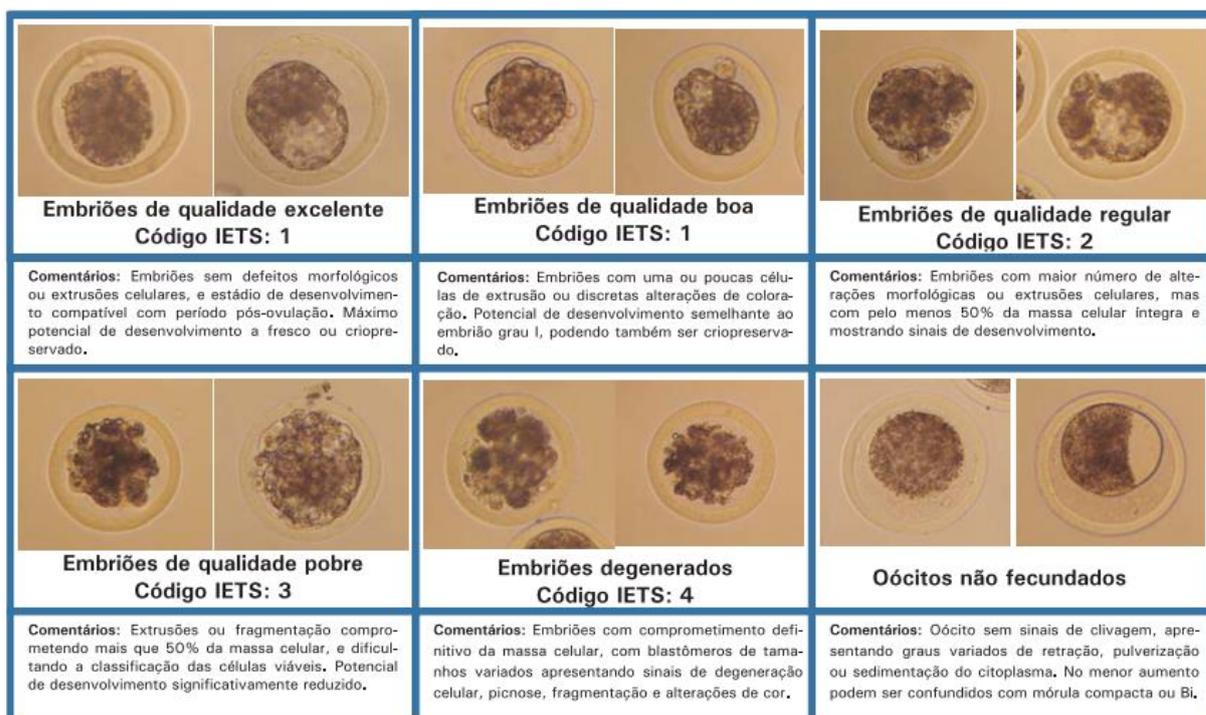


Figura 22. Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo de acordo com a qualidade morfológica.

Fonte: Viana, 2009.

3.4.3. Contaminação de placas

Durante os 7 dias de cultivo pode haver o desenvolvimento de bactérias e leveduras em gotas contaminadas (Figura 23;24). A contaminação pode ocorrer em diversos momentos, incluindo no campo, durante a aspiração e procedimentos de manipulação dos oócitos, e no laboratório, em qualquer etapa de manipulação e preparação dos procedimentos, contaminação dos meios utilizados ou utilização de doses de sêmen contaminadas.

A taxa aceitável de contaminação mensal no laboratório é de 3%, sendo que durante os meses de estágio os níveis se mantiveram inferiores a este valor. Desta forma, foi possível acompanhar raros casos de contaminação, sendo que a medida adotada consistia no bloqueio de qualquer manipulação da gota contaminada, evitando a disseminação para as outras gotas presentes na mesma placa.

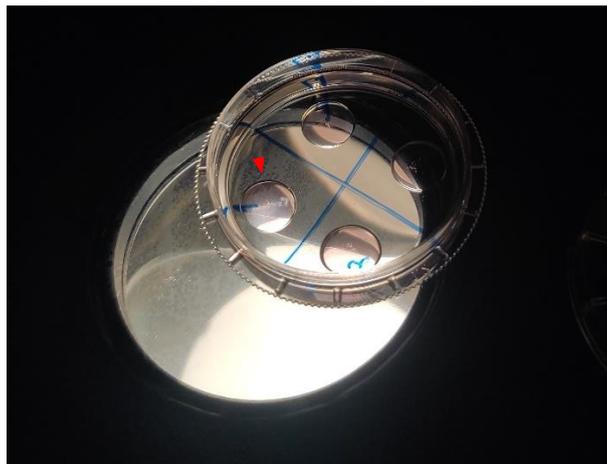


Figura 23. Seta vermelha: gota de CIV contaminada apresentando aspecto turvo.



Figura 24. Imagens obtidas no estereomicroscópio de gotas de CIV contaminadas por bactérias e leveduras.

Para reduzir os riscos de contaminação na produção de embriões, o laboratório Embriza adota uma série de medidas de controle. Primeiramente, os profissionais e estagiários passam por processo de higienização das mãos e instrumentação com jaleco, touca, máscaras e sapatos de uso restrito ao laboratório, antes de entrarem na área laboratorial, além disso, todos os equipamentos e materiais utilizados durante as etapas de produção, como ponteiras, placas e tubos são estéreis e descartáveis, já as capelas são mantidas sempre limpas e desinfetadas com álcool 70%. Os meios utilizados também são mantidos sob condições que garantam a não contaminação e quando há utilização de doses de sêmen de touros com histórico de contaminação ou que sejam coletados na fazenda, é adotada a medida preventiva com uso de antibiótico acrescentado no meio CIV.

Os tubos de MIV são armazenados na incubadora por um período de uma semana para que, em casos de contaminação, possam ser reavaliados na tentativa de identificar o foco inicial. São gerados relatórios mensais de contaminação com o objetivo de analisar os dados obtidos e tomar medidas necessárias caso os parâmetros estejam acima do limite, fato que não ocorreu no decorrer do estágio obrigatório.

3.5. Envase de embriões

No dia 7 do cultivo os embriões já se encontram prontos para serem transferidos à fresco em receptoras previamente sincronizadas e aptas para a transferência, podendo estar nas fases de mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido ou blastocisto expandido (Figura 25). Para isto, é realizado o envase individual dos embriões em paletas de 0,25ml juntamente com meio de envase, previamente estabilizado na incubadora.

O processo é realizado com auxílio de seringa e ponteira acoplada, seguindo o processo de ordem das colunas: meio, ar, meio, ar, meio juntamente com o embrião, ar, meio, ar e meio. Após preencher a paleta é realizado o fechamento da extremidade com o lacrador. Todos os embriões são identificados, onde recebem o número da ordem do envase na extremidade do lacrador, e na folha de controle o número corresponderá ao acasalamento e classificação morfológica do embrião. Posteriormente, os embriões vão sendo colocados no transportador de embriões com temperatura controlada em 36°C, onde permanecerão até a realização da transferência na fazenda (Figura 26).

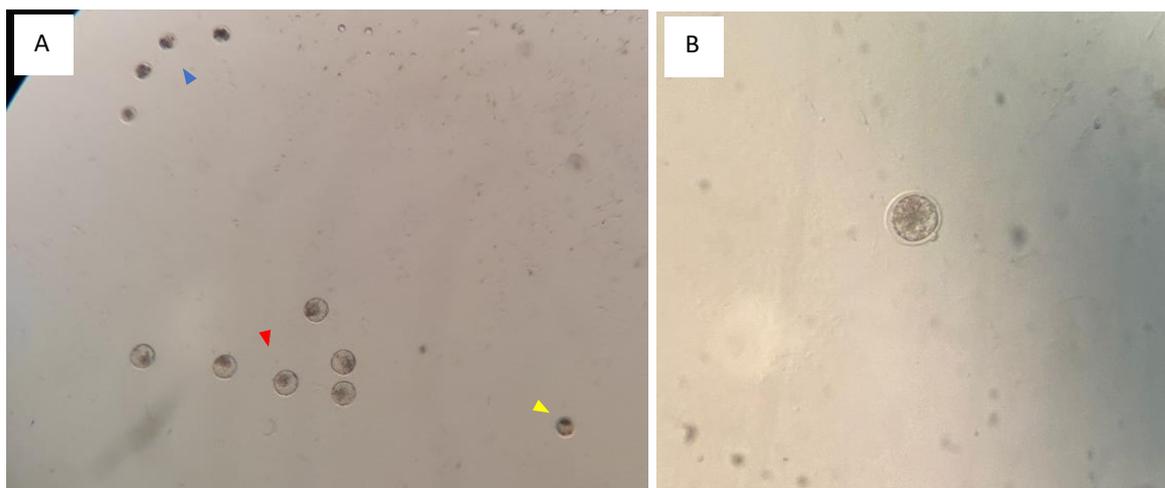


Figura 25. Embrões aptos para envase. Sendo A) Seta azul: Blastocistos iniciais, amarela: blastocisto e vermelha: blastocistos expandidos; B) Blastocisto eclodido.



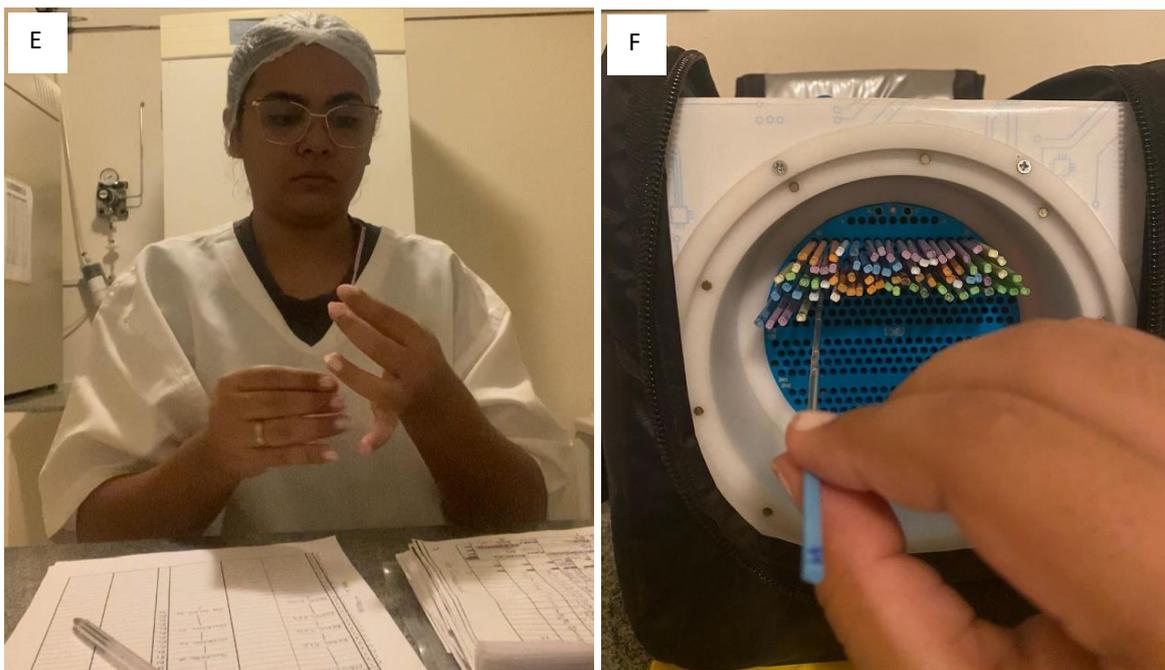


Figura 26. Etapas do procedimento de envase de embriões. A) Avaliação e classificação dos embriões produzidos; B) Pipetagem dos embriões da placa de CIV para o meio de envase; C) Envase individual dos embriões em paletas de 0,25ml com auxílio de seringa de insulina; D) Anotação das informações na folha de TE (ordem, acasalamento, classificação do embrião); E) Fechamento da paleta com o lacre identificado com a ordem numérica do envase; F) Acondicionamento das paletas no transportador de embriões.



Figura 27. Paletas de embriões prontas, lacradas e identificadas.

3.6. Criopreservação de embriões

Além da transferência à frescos dos embriões, também é possível realizar procedimentos de criopreservação dos mesmos, sendo uma técnica essencial na PIVE, pois possibilita o armazenamento de embriões por longos períodos e a utilização em situações de excedente da produção ou escassez de receptoras, além de permitir o comércio de excelente material genético em todo o mundo (Garcia, 2023). Dentre os métodos utilizados se encontram a vitrificação e o DT (*Direct Transfer*), em que apenas embriões classificados como blastocisto expandido e com ótimas características morfológicas, código 1 da IETS (Figura 22)

são criopreservados, considerando o dia 7 e a manhã do dia 8 de cultivo (Figura 28).

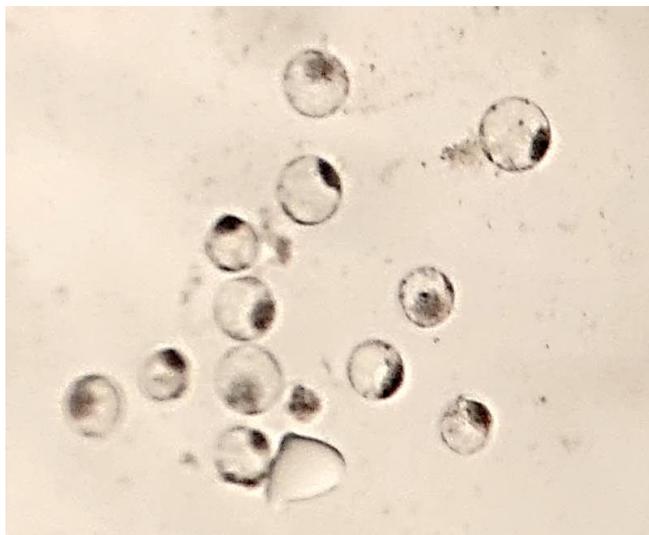


Figura 28. Blastocistos expandidos aptos para procedimentos de criopreservação.

3.6.1. Vitrificação

A vitrificação (congelamento rápido) consiste no uso de soluções de alta osmolaridade para retirar rapidamente a água intracelular, gerando desidratação das células embrionárias e as tornando permeáveis ao crioprotetor. Desta maneira, o embrião é capaz de resistir a imersão no nitrogênio líquido sem formar cristais de gelo no seu interior (VAJTA et al., 1998).

Para o procedimento é utilizado a placa de quatro poços onde são colocados 800 μ L de meio LAV + 100 μ L de etilenoglicol + 100 μ L de DMSO no poço 1, 300 μ L de sacarose + 100 μ L de etilenoglicol + 100 μ L DE DMSO no poço 2 e 800 μ L de meio LAV no poço 3 e 4 (Figura 29). Os embriões são retirados das gotas de meio CIV e colocadas no meio LAV (poço 3 ou 4) para a remoção do meio e possíveis sujidades. Posteriormente são transferidas para o poço 1 onde permanecem por 1 minuto e, posteriormente, é pipetado uma gota do meio do poço 2 em uma placa, onde esses embriões serão colocados e submetidos ao nitrogênio líquido em até 20 segundos (Figura 30).

O envase é realizado em calhas (Figura 29) que comportam até 5 embriões do mesmo acasalamento. Todas as paletas são previamente identificadas, assim

como as raques onde ficarão armazenadas na caneca do botijão de nitrogênio. Cada raque comporta até 5 calhas com embriões.

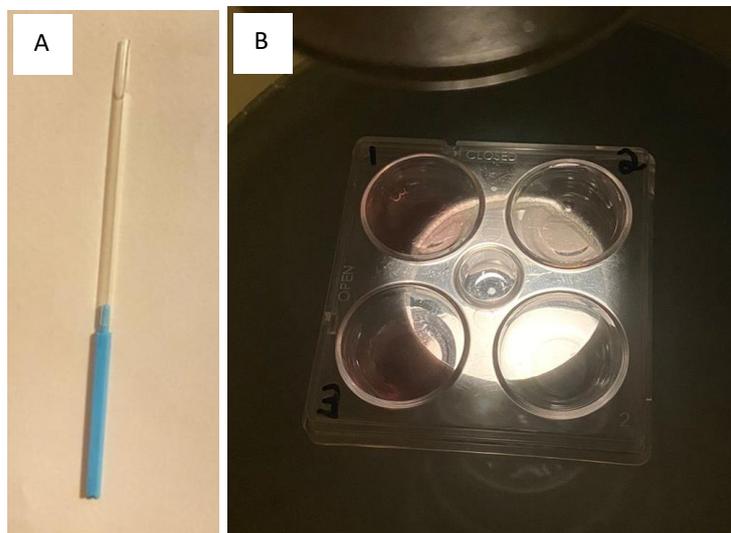
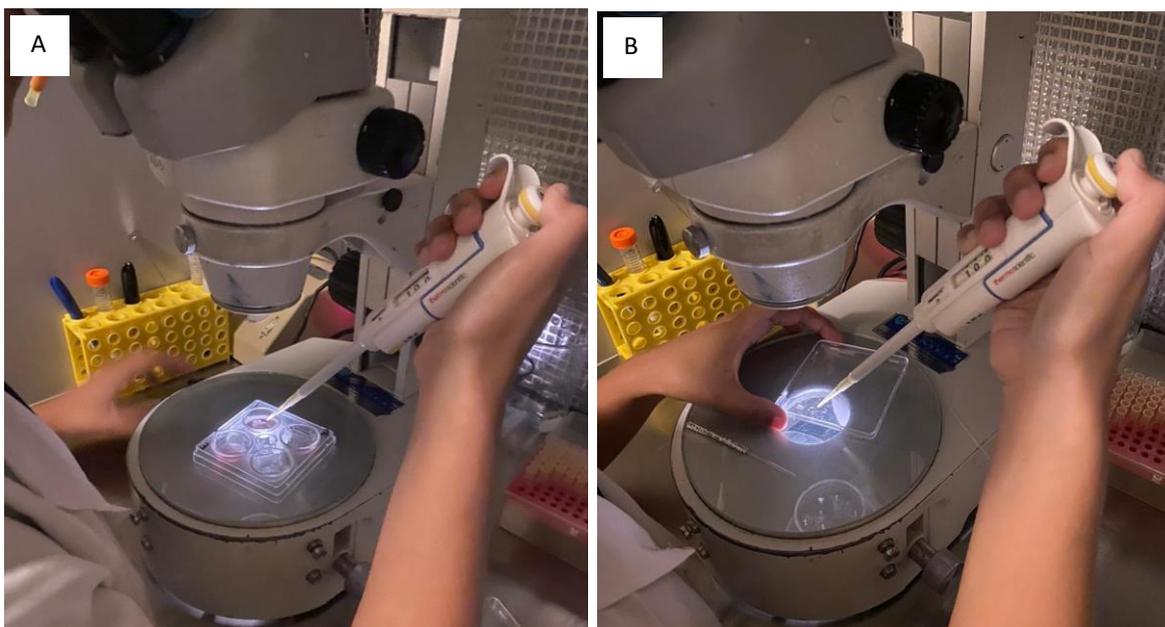


Figura 29. A) Calhas utilizadas para a vitrificação do embrião; B) Placa de 4 poços com os meios utilizados no procedimento.



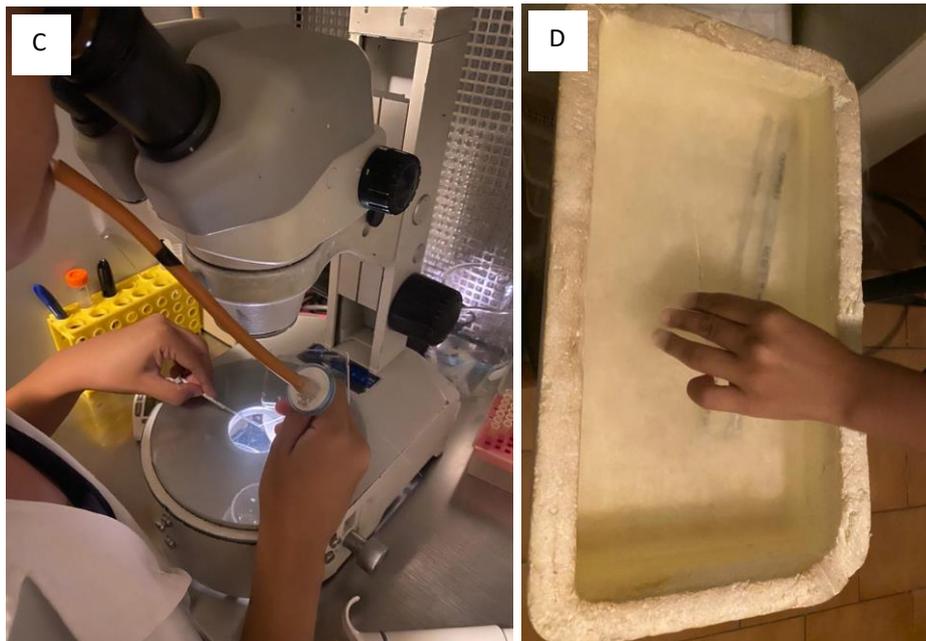


Figura 30. Etapas da vitrificação de embriões. A) Deposição dos embriões no poço 3 da placa, composto por meio LAV; B) Embriões sendo depositados na gota de meio do poço 2 (sacarose, etilenoglicol e DMSO); C) Deposição dos embriões na calha com auxílio da ponteira de vidro acoplada ao babador; D) Colocação da calha com os embriões na caixa de isopor com nitrogênio líquido.

3.6.2. *Direct Transfer (DT)*

As principais vantagens desta técnica de congelamento lento consistem no uso de baixos níveis de crioprotetores, que em excesso causam toxicidade embrionária, e a possibilidade de ser transferido de maneira direta na fazenda, ou seja, sem a necessidade de reaquecimento com meios próprios, apenas realizando o descongelamento em banho maria (SANCHES et al., 2017; GOMEZ et al., 2020).

Em uma placa de petri são pipetadas duas gotas de meio de envase pré-aquecido na estufa para cada gota de meio CIV. Posteriormente, os embriões presentes na placa de cultivo são transferidos para as gotas de meio de envase para lavagem, passando os embriões de uma gota para outra. Em seguida, as estruturas são colocadas na placa de 4 poços com meio DT, composto por etilenoglicol, onde podem permanecer por 10 minutos, período máximo para envasar todos os embriões presentes nos quatro poços. O envase é realizado individualmente em paletas de 0,25ml, seguindo o mesmo processo do envase a fresco. A paleta é lacrada com os lacradores previamente identificados.

Antes de iniciar todo o procedimento, o equipamento de controle de temperatura (FREEZE CONTROL®) é programado para estabelecer a temperatura em -6°C do nitrogênio colocado em uma caixa de isopor. Após os embriões serem envasados e lacrados, as paletas são colocadas no equipamento onde permanecem por 2 minutos. Após este tempo, é realizado o *seeding*, que consiste em uma indução para iniciar o congelamento, onde é realizada o congelamento das colunas de meio DT nas extremidades da coluna do embrião com o auxílio de um cotonete embebido no nitrogênio. Em seguida tem início a curva gradual de resfriamento controlado, cuja taxa pode variar entre 0,3 a 0,5 graus Celsius por minuto, até alcançar a temperatura final de -32°C , onde permanece por mais 10min para depois entrar em contato direto com o nitrogênio, finalizando o processo (Figura 31).

As palhetas são armazenadas em raques também previamente identificadas e, posteriormente, são realocadas no botijão de nitrogênio onde permanecerão até sua utilização em transferência de embriões.



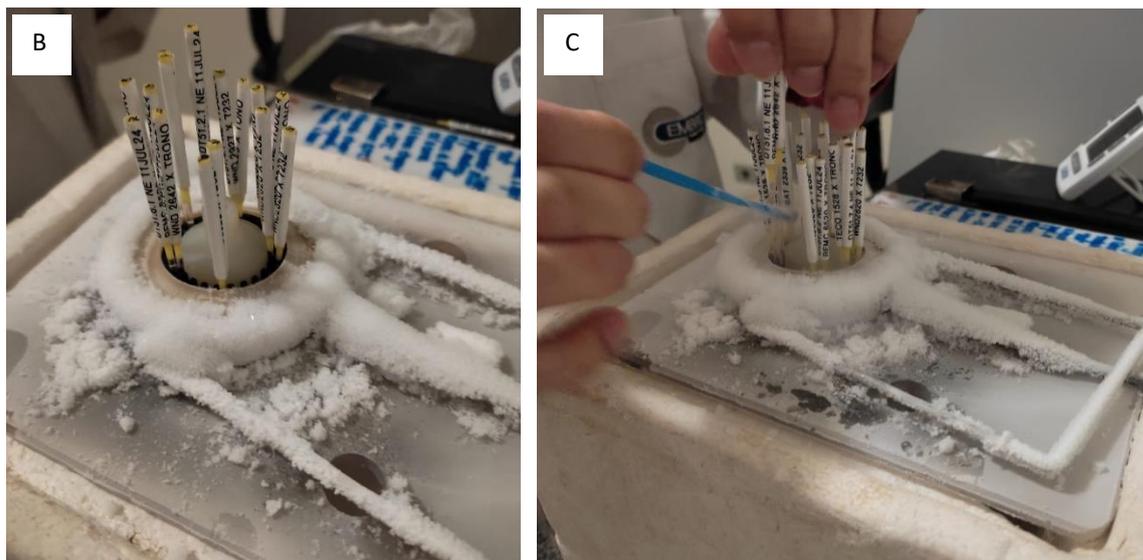


Figura 31. *Direct Transfer.* A) equipamento de controle de temperatura (FREEZE CONTROL®) e caixa de isopor com nitrogênio líquido; B) Acondicionamento das calhas contendo os embriões no equipamento; C) Etapa do *seeding*.

3.7. Transferência de embriões

Os animais são imobilizados no tronco de contenção em pé e submetidos a aplicação de 4ml de Bloc® na região epidural. Posteriormente realiza-se a avaliação dos ovários por palpação retal e, quando necessário, utiliza-se a ultrassonografia, afim de identificar a presença do corpo lúteo para posterior inovulação do embrião. Em casos de a receptora não possuir corpo lúteo, a mesma é refugada e não participa da transferência de embrião.

No caso de embriões a fresco, são transferidos aquelas que se encontram nos estágios de blastocisto inicial, blastocisto ou blastocisto expandido, apenas em casos de necessidade, como número de embriões insuficientes, o laboratório Embriza utiliza embriões na qualidade de mórula ou blastocisto eclodido. Já com embriões criopreservados, apenas os blastocistos expandidos são utilizados.

A transferência é realizada utilizando aplicador de embrião bovino, baina para TE juntamente com o plástico sanitário, seguido da inovulação do embrião no corno adjacente ao ovário com o CL previamente diagnosticado. Após a conclusão do procedimento, é realizado o brincamento das receptoras com informações sobre a data da transferência e acasalamento do embrião transferido.

3.8. Lançamento de dados no sistema Multbovinos

Durante o estágio obrigatório, foi possível acompanhar e realizar lançamentos de dados no software Multbovinos (Figura 32). Este sistema trabalha de maneira integrada para atender as diversas necessidades e todos os elos da cadeia produtiva, atuando em todos os níveis do negócio pecuário, desde a automatização e controle de cada manejo até o nível mais estratégico, orientando nas decisões com foco no aumento da produtividade e na garantia de maior rentabilidade para a empresa (MULTSOFT, 2010).

Eram lançados dados completos de todas as etapas, desde a aspiração folicular, acasalamento, taxa de clivagem, produção final, até a transferência do embrião, diagnóstico gestacional e sexagem, incluindo números individuais de cada doadora e identificação das receptoras. Além disso, o sistema permite a emissão de diversos relatórios, sendo possível analisar dados, contribuindo para avaliação de resultados e tomadas de decisões.



Figura 32. A) Logo do sistema Multbovinos; B) Lançamento de dados no sistema pela estagiária Maria Clara. Lançamento de dados no sistema pela estagiária Maria Clara.

Fonte: Multsoft, 2010

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio curricular obrigatório realizado na empresa Embriza Tecnologia, localizada em Campo Grande - MS, contribuiu significativamente para o desenvolvimento profissional e pessoal da estagiária, permitindo a vivência da rotina do Médico Veterinário e aquisição de conhecimento técnico e teórico nas especialidades de reprodução bovina, em especial na PIVE. A experiência foi de suma importância para que a estagiária agregasse o conhecimento na área, possibilitando o aperfeiçoamento e aquisição de novas técnicas de trabalho através de exercícios e práticas supervisionadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSUMPÇÃO, M. et al. **Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros**. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 39, p. 149–156, 2002.

BARUSELLI, P. et al. **Estratégias para aumentar a produção de embriões em bovinos**. Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA - 2019) Gramado, RS, 15 a 17 de maio de 2019.

BATISTELA, M. V. V.; PEREIRA, J. L. S. A. et al. **Produção in vitro de embriões e novas estratégias na produção de oócitos em bovinos**. Enciclopédia biosfera, v. 20, n. 46, 30 dez. 2023.

BAVISTER, B. D. **Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts**. Human Reproduction Update, v. 1, n. 2, p. 91-148, 1995.

FERRÉ, L. et al. **Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods**. Animal, v. 14, n. 5, p. 991-1004, 2020.

FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A. et al. **Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence**. Theriogenology, v. 71, p. 836-848, 2009.

GARCIA, L. N.; CROCOMO.. **Aspectos técnicos da produção embrionária in vitro bovina: revisão de literatura**. Editora Científica Digital eBooks, p. 38–53, 1 jan. 2023.

GIMENES, L. et al. **The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not**

significantly affect in vitro embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. Theriogenology, v. 83, n. 3, p. 385-393, 2015.

GOMEZ, E. et al. **Efficient one-step direct transfer to recipients of thawed bovine embryos cultured in vitro and frozen in chemically defined medium.** Theriogenology, v. 146, p. 39-47, 2020.

GONÇALVES, P. et al. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal e à Humana.** 3. ed. São Paulo: Roca, 2021. 20 v.

MILLER, G. et al. **Addition of penicillamine, hypotaurine and epinephrine (PHE) or bovine oviductal epithelial cells (BOEC) alone or in combination to bovine in vitro fertilization medium increases the subsequent embryo cleavage rate.** Theriogenology, v. 41, n. 3, p. 689-696, 1994.

MULTISOFT. **O Multbovinos.** 2018. Disponível em:
<<https://www.multsoft.agr.br/bovinos/o-multbovinos/>> Acesso em: 29 ago. 2024.

OLIVEIRA, C. S.; SARAPIÃO, R. V.; et al. **Biotécnicas da Reprodução em Bovinos.** Documentos 175. 2014. Disponível em:<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1015853/1/BiotecnicaParaProducaoemBovinos.Documentos175.pdf>> Acesso em: 24 ago. 2024.

PALMA, G. A.; OLIVER, N. S.; NEUMULLER, C. H.; SINOWATZ, F. **Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of in vitro fertilization and ultrastructure of in vitro produced bovine blastocysts.** Anatomy, Histology and Embryology, v.77, p.67-73, 2008.

RIZOS, D. et al. **Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality.** Reproduction in Domestic Animals, v. 43, p. 44-50, 2008.

SANCHES, B. et al. **Cryopreservation of in vitro-produced embryos: challenges for commercial implementation.** Anais da 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE); Cabo de Santo Agostinho, PE, Brasil, 17 a 19 de agosto de 2017.

SMITZ, J. E. J.; NOGUEIRA, D. et al. **Oocyte: in vitro maturation.** In: SUH, C. S.; SONNTAG, B.; ERICKSON, G. F. The ovarian life cycle: a contemporary view. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, v. 3, p. 5-12, 2004.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões.** IETS, p. 112-113, Illinois, 1998.

VAJTA, G. et al. **Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos.** Mol Reprod Dev, v. 51, p. 53-58, 1998.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. **Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução.** Rev. Bras. Reprod. Anim., v. 32, p. 100-109, 2008.

VIANA, J.H.M. **Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo**. 2009. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/65449/1/COT-59-Classificacao-de-embrioes.pdf>> Acesso em: 21 ago. 2024.

WILSON, R. D.; FRICKE, P. M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; RUTLEDGE, J. J.; SYVERSON PENFIELD, C. M. WEIGEL, K. A.. **In vitro production of bovine embryos using sex-sorted sperm**. Theriogenology, v.65, p.1007-1015, 2006.

II – Trabalho de Conclusão de Curso

O CORPO LÚTEO EM RECEPTORAS DE EMBRIÕES BOVINAS: RELAÇÃO ENTRE MORFOLOGIA E CONCEPÇÃO

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Histórico da transferência de embriões

As primeiras transferências de embriões (TE) em mamíferos foram relatadas no ano de 1891, com o estudo desenvolvido por Walter Heape em coelhas, desde então a técnica foi relatada em todas as espécies de animais domésticos (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Em 1949 foi relatado o primeiro caso de sucesso após uma coleta cirúrgica de embriões da tuba uterina e do útero de uma vaca superovulada por Umbaugh, resultando em gestações. Os experimentos foram repetidos por Willet em 1951, com o relato do primeiro bezerro nascido por meio de um procedimento cirúrgico (CARVALHO et al., 2023). Posteriormente, inúmeros estudos foram realizados, contribuindo para o desenvolvimento e posterior comercialização dessa tecnologia na América do Norte durante a década de 1970 (HAFEZ e HAFEZ, 2004). No Brasil a primeira TE foi realizada em 1977 na Universidade Federal de Santa Maria pelo Prof. Dr. Joachim Hahn, mas infelizmente não resultou em gestação. Somente por volta dos anos de 1979 que nasceu o primeiro bezerro de TE no Brasil (RUBIN, 2005).

A transferência cirúrgica via laparotomia foi a primeira técnica utilizada na TE, por meio desta, os animais eram submetidos a sedação, realizava-se uma incisão na fossa paralombar permitindo acesso a cavidade, o útero era exteriorizado e o embrião depositado no corno ipsilateral à ovulação (PAZZIM, 2021). Com o passar dos anos, iniciou-se uma busca por novas formas de TE menos invasivas, chegando-se à técnica transvaginal, que é até hoje utilizada por sua praticidade e segurança (SEIDEL, 2005).

A produção de embriões bovinos teve início com a produção *in vivo*, por meio da superovulação (SOV) e lavagem uterina, posteriormente iniciou-se a produção *in vitro* (PIVE), que ganhou ainda mais espaço com o advento da aspiração folicular. Pieterse et al. (1988) relataram a utilização da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom, passo importante para a viabilidade e aplicabilidade da técnica a nível comercial. A expansão da utilização da PIVE e a virada histórica para que essa biotécnica fosse aplicada em larga escala tanto no campo científico como comercial se deu pelo desenvolvimento de técnicas de aspiração folicular.

O primeiro relato de bezerro nascido por FIV ocorreu em 1982, mas este não foi compreendido por PIVE completa, visto a maturação de oócitos *in vivo*. O procedimento de coleta de oócitos de TE para este animal foi realizado por laparotomia central média. A recuperação de oócitos mediante laparoscopia foi conduzida em 1983, enquanto a indução da superovulação (SOV), foi utilizada em 1985 (SIRARD et al., 1985).

A década de 90 representou um período de estabelecimento da PIVE, parâmetros de controle de qualidade foram estabelecidos, a fim de reduzir a toxicidade nas células manipuladas, determinação de pontos críticos e aumento da produtividade final. A partir disso, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) foi capaz de produzir o primeiro bovino brasileiro totalmente *in vitro* (RUMPF, 2002). No final de 1998, a utilização de métodos de vitrificação de embriões possibilitou o armazenamento de material biológico por maiores períodos de tempo (VAJTA et al., 1998).

A chegada dos anos 2000 representou o estabelecimento e expansão da técnica do ponto de vista comercial. Nos cinco primeiros anos, o Brasil atingiu o patamar de líder na PIVE e, se tornou referência mundial na utilização da técnica em bovinos. Segundo Lima et al. (2014), o alto crescimento na utilização e adesão da PIVE no Brasil, ocorreu principalmente por fatores de mercado favoráveis, eficiência intrínseca na produção de embriões, desenvolvimento de tecnologias associadas e investimento em pesquisas. A disponibilidade de utilização de sêmen sexado, a partir de 2005, contribuiu para que em 2017, se consolidasse como a técnica de eleição para a produção de embriões bovinos, tanto taurinos quanto zebuínos de corte e/ou leite.

1.2. Cenário da PIVE e TE no Brasil

O mercado brasileiro de embriões bovinos possui aspecto dinâmico e é marcado por algumas mudanças em segmentos específicos que consolidaram ou reverteram tendências observadas nos anos anteriores a 2022 (O EMBRIÃO, 2022). Ainda de acordo com O Embrião, 2022, observou-se uma pequena alta do número de embriões comunicados às associações de raça, (+3,9%), seguindo a tendência de aumento observada desde 2019 e o aquecimento do mercado de genética subsequente à pandemia, já o mercado de bainhas de TE reduziu (-16,1%), como observado na Figura 1. O comportamento recente desses dois indicadores parece sugerir uma tendência inversa, ou seja, a produção e embriões oscilaria entre os segmentos de genética selecionada ou de animais comerciais, conforme as circunstâncias de mercado.

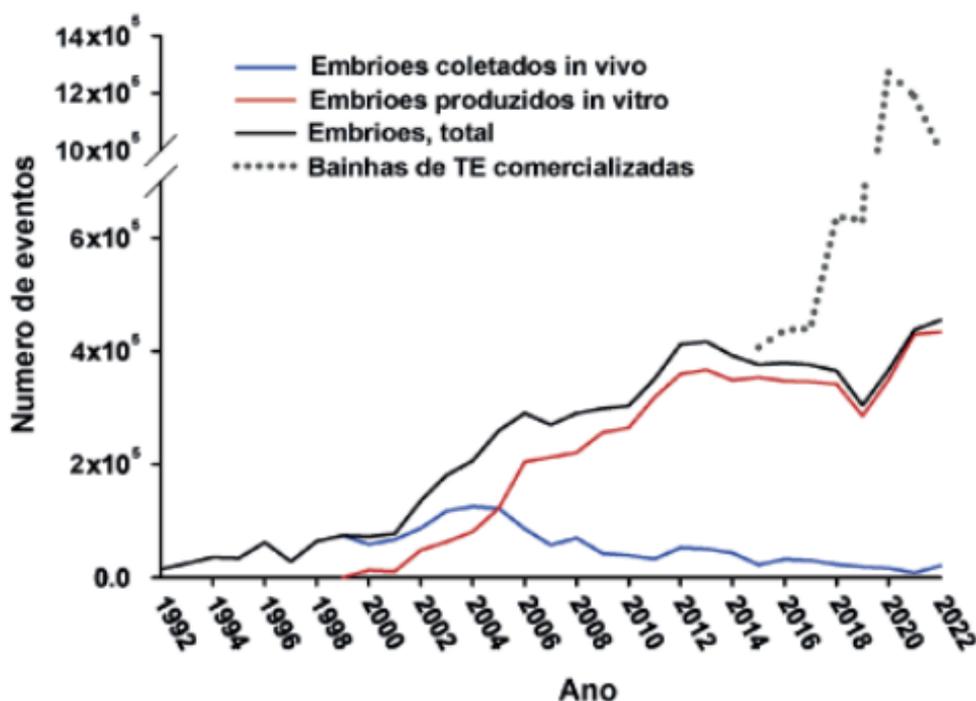


Figura 1. Série histórica do número de embriões bovinos coletados in vivo (IVD), produzidos in vitro (IVP) e total no período 1992-2022, e também de bainhas de transferência de embriões (TE) comercializadas no Brasil entre 2015 e 2022.

Fonte: Jornal O Embrião, 2022.

Em relação à tecnologia, em 2022, a coleta de embriões *in vivo* representou apenas 4,6% do total, com aumento de +156,3%, demonstrando a resiliência desse nicho de mercado. O percentual de embriões produzidos *in vitro* e transferidos após

criopreservação apresentou pequeno aumento de 2021 para 2022 (+1,1%), correspondeu a 35,1% do total de transferências realizadas em 2022 (Figura 2). No caso dos embriões coletados *in vivo*, pela primeira vez desde 2013, mais transferências foram realizadas a fresco que após criopreservação provavelmente reflexo da retomada observada nesse nicho em 2022 (O EMBRIÃO, 2022).

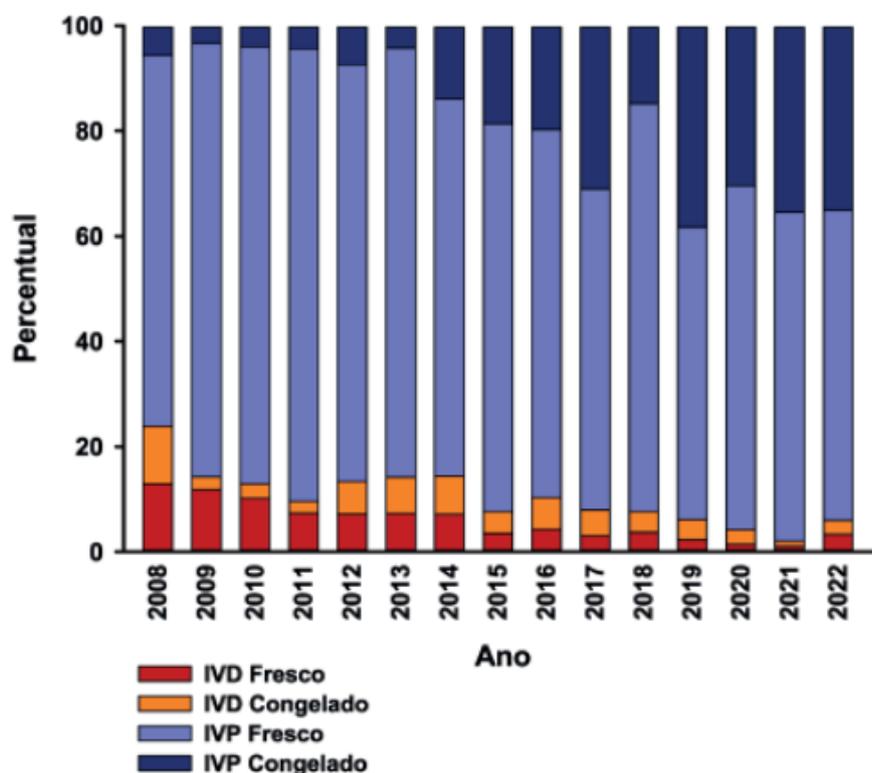


Figura 2. Distribuição percentual dos embriões bovinos coletados *in vivo* (IVD) ou produzidos *in vitro* (IVP) e transferidos a fresco ou após congelado, entre 2008 e 2022.

Fonte: Jornal O Embrião, 2022.

De acordo com Viana (2022) embora os Estados Unidos tenham registrado mais produção de embriões *in vitro* do que o Brasil (642.559 vs. 441.787, respectivamente), a proporção de embriões realmente transferidos foi menor no primeiro em comparação com o último. Dessa forma, o Brasil se mantém como líder em transferências de embriões PIV no mundo (435.359, correspondendo a 36,6% do total mundial).

1.3. Seleção das receptoras

O sucesso dos programas de transferência de embriões depende de vários fatores, dentre eles a disponibilidade de receptoras aptas à inovulação (BARUSELLI et al., 2004). Entretanto, observa-se que a atenção é especialmente voltada para a doadora, deixando as receptoras em segundo plano de manejo, o que se reflete em baixa taxa de gestação e alta taxa de mortalidade embrionária (FERNANDES, 1999), contribuindo para um ponto de estrangulamento para a eficiência de um programa de TE, o custo fixo de manutenção de um grande número de receptoras por doadora.

Vários fatores interferem na taxa de prenhez das receptoras, dentre eles os extrínsecos, como nutricionais, manejo, fatores ambientais e suas interações, e os intrínsecos, que são mais complexos e envolvem hormônios, morfologia e qualidade de corpo lúteo, produção de progesterona, contratilidade uterina, embrião, estágio de desenvolvimento embrionário, sincronia entre doadora e receptora além das possíveis interações entre os mesmos (OYUELA; JIMENEZ, 2010).

Alguns estudos encontraram uma maior taxa de prenhez para fêmeas que apresentaram CL com maior área e concentração de P4 circulante (BARUSELLI et al., 2000; BINELLI et al., 2001). Nogueira et al. (2012) encontraram diferença significativa na taxa de prenhez de receptoras que apresentaram maior diâmetro de CL no momento da inovulação, quando comparadas àquelas não gestantes. Os níveis plasmáticos de P4, no momento da inovulação influenciaram significativamente a prenhez de receptoras no experimento de Costa e Silva et al. (2010), já Costa et al. (2011) não observaram diferenças significativas entre a concentração plasmática de P4 no momento da inovulação de receptoras gestantes comparadas às não gestantes.

A sincronia doadora x receptora, de acordo com Costa Filho et al. (2013) é uma etapa essencial para que o embrião da doadora e o útero da receptora a ser inovulada estejam no mesmo estágio fisiológico de desenvolvimento, garantindo bons resultados de prenhez. A manipulação do ciclo estral das receptoras permite melhorar os resultados da TE, pois é possível ter um CL funcional no momento da

inovulação, aumentando a concentração plasmática de P4 e conseguindo um ambiente mais propício para manter a gestação (JONES; LAMB, 2008).

Os fatores extrínsecos, como o estresse térmico, causado por alta temperatura, umidade e radiação podem reduzir a eficiência do animal em perder calor, levando ao estresse por calor, comprometendo a reprodução (SILVA et al., 2006). Medidas simples como manter as receptoras em ambiente sombreado, com água e comida enquanto aguardam a inovulação podem melhorar a taxa de prenhez (COSTA FILHO et al., 2013). Outro ponto importante é a nutrição, sendo também um dos fatores que podem alterar a fisiologia reprodutiva de fêmeas bovinas. Deficiências vitamínicas e/ou minerais, efeitos deletérios de compostos nitrogenados e altos níveis energéticos, balanço energético negativo, queda de escore de condição corporal são alguns dos aspectos negativos relacionados à eficiência da reprodução de bovinos (OYUELA; JIMENEZ, 2010; SARTORI; GUARDIEIRO, 2010).

Portanto, é necessário entender os fatores que auxiliam na seleção de receptoras, responsáveis por gerar variações nos resultados de programas de transferência de embriões. Para, posteriormente, buscar soluções e aumentar a taxa de aproveitamento e prenhez, diminuindo perdas com protocolos e, assim, reduzir custos de produção (FUCK et al., 2002).

1.4. Corpo lúteo

1.4.1 Luteogênese

O desenvolvimento do CL no ovário tem início imediato após a ovulação, com a remodelação do tecido remanescente do folículo recém ovulado, resultando em mudanças bioquímicas com o bloqueio da produção de estradiol (E2) e início da produção crescente de progesterona (P4). Após a ovulação, a parede do folículo recém-ovulado é colapsada e se projeta em direção à parte central desse folículo, onde a cavidade deste é invadida por linfa e sangue provenientes da vascularização intensa na região. Neste momento, há a formação do corpo hemorrágico, que compreende o conjunto de elementos, como células remanescentes da teca e

granulosa, sangue e linfa. Nesta estrutura, inicia-se uma hiperplasia (multiplicação celular) das células remanescentes da teca, fibroblastos e células endoteliais, e uma hipertrofia (aumento de volume celular) das células remanescentes da teca e especialmente da granulosa (MEMBRIVE et al., 2024).

A luteinização engloba mudanças morfológicas através da multiplicação, diferenciação e reorganização das células remanescentes da teca e da granulosa, que dão origem às células esteroidogênicas luteais pequenas (SLC) e células esteroidogênicas luteais grandes (LLC), respectivamente, juntamente com uma intensa reconstrução vascular (MEMBRIVE et al., 2024). De acordo com Bertan et al. (2006), essas células, sintetizam e liberam P4 na circulação sistêmica com o objetivo de iniciar um processo de quiescência na contratilidade do miométrio e propiciar o desenvolvimento glandular do endométrio, promovendo um ambiente uterino adequado para o desenvolvimento do conceito. Além disso, as LLC também sintetizam e secretam ocitocina, que exerce um papel importante na síntese de prostaglandina F₂-α (PGF₂-α), portanto na luteólise.

Quando a remodelação se completa e a estrutura torna-se apta a sintetizar e secretar grandes quantidades de P4, esta caracteriza-se como CL. A vascularização exuberante do CL é fundamental para que as LLC e as SLC possam encontrar facilidade na captação de colesterol, precursor da P4, além de favorecer a rápida passagem da P4 sintetizada para a circulação sistêmica, onde exercerá sua função nos órgãos alvo, especialmente no hipotálamo e no útero (MEMBRIVE et al., 2024). Em algumas espécies o CL também é responsável pela síntese de outros hormônios como ocitocina, inibina e relaxina. Especialmente em ruminantes, a ocitocina constitui um dos hormônios que determinam a luteólise. A inibina induz a um bloqueio na liberação de FSH retardando o desenvolvimento folicular (BERTAN et al., 2006).

O tempo de permanência do CL no ovário em fêmeas bovinas ciclando é de aproximadamente 17 a 18 dias, considerando o período de metaestro (corpo hemorrágico) e diestro (CL propriamente dito). Quando as fêmeas se tornam prenhes, a permanência do CL no ovário persiste ao longo da prenhez até por volta de 5 dias antes do parto. Durante a prenhez, a placenta adquire uma capacidade crescente de sintetizar P4 e assume o papel de maior mantenedora aproximadamente a partir dos 120 dias de prenhez. A produção de P4 pela placenta complementa a P4 produzida pelo CL, garantindo altas concentrações plasmáticas

de P4, que serão fundamentais na manutenção da prenhez. A síntese de P4 pelo CL é bastante complexa e será apresentada a seguir (MEMBRIVE et al., 2024).

1.4.2. Produção de progesterona

O substrato para a produção de P4, assim como do E2, é o colesterol, sintetizado principalmente no fígado e transportado na corrente sanguínea pelas lipoproteínas. Estas caracterizam-se por ser de alta (HDL – high density lipoprotein) ou baixa densidade (LDL – low density lipoprotein), sendo o último a maior fonte de colesterol para a produção de P4. Após a ovulação, as células da teca e granulosa remanescentes do folículo ovulatório, que até então secretavam E2, são reorganizadas para formar o CL e sintetizar P4, por meio da diminuição na expressão de todas as enzimas que participavam das diferentes etapas na transformação de pregnenolona em E2. Esse evento determina o início da luteinização das células da teca e da granulosa. Além disso, para que a síntese de P4 ocorra, há um aumento na expressão das enzimas P450scc e 3- β -HSD (b-hidroxiesteróide desidrogenase), ambas necessárias para a síntese de P4 a partir do colesterol (MEMBRIVE et al., 2024).

As SLC se caracterizam por liberarem baixas concentrações de P4 e apresentarem receptores para LH (depende de LH), enquanto as LLC produzem altas quantidades de P4 e não apresentam receptores de LH (independe de LH). As LLC representam minoria na porcentagem de células esteroidogênicas totais, entretanto se responsabilizam por aproximadamente 80% da produção total de P4 pelo CL. As SLC representam maioria na porcentagem de células esteroidogênicas totais, mas se responsabilizam por aproximadamente 20% da produção total de P4 pelo CL (MEMBRIVE et al., 2024).

Resumidamente, as etapas da produção de P4 se iniciam com a ligação do LDL a receptores específicos na membrana celular, especialmente a apoproteína D, presentes nas SLC e nas LLC, permitindo sua entrada na célula por meio de endocitose. No citosol, o LDL combina-se com o lisossomo para que seja dissociado e libere moléculas de colesterol. Por sua vez, o colesterol presente no citosol da célula passa a ser disponibilizado como substrato para a esteroidogênese, sendo convertido pela enzima P450scc em pregnenolona que,

posteriormente, é convertida pela enzima 3- β -HSD em P4. Ambas as enzimas necessárias para a síntese de P4 estão presentes nas LLC e nas SLC (MEMBRIVE et al., 2024).

1.4.3. Corpo lúteo cavitário

Antigamente, o corpo lúteo cavitário em bovinos era considerado de origem patológica e denominado como “corpo lúteo cístico”, na atualidade já foi descrito que esta estrutura assume uma condição fisiológica (GULARTE, 2019). Entretanto, segundo Bartyomiej et al. (2021), embora seja considerada uma estrutura lútea com atividade comparável ao CL compacto, tanto em termos de capacidade secretora quanto de eficácia na manutenção da gestação, o mecanismo de formação da cavidade no interior do CL ainda não foi esclarecido.

Por outro lado, Gularte (2019) afirma que o CL cavitário é o fechamento prematuro do local onde ocorreu a ovulação, resultando de uma falha da hipófise, que acaba liberando uma quantidade de hormônio luteinizante insuficiente, para o adequado desenvolvimento do corpo lúteo. Em um estudo realizado por Rizzo et al. (2016) mostraram que as concentrações de P4 no fluido cavitário eram muito altas, enquanto os valores de colesterol eram semelhantes aos encontrados no soro. Tendo em vista que um CL inicial é formado por parede folicular colapsada e que a cavidade CL é o remanescente do antro folicular, é concebível que o fluido da cavidade do CL tenha composição semelhante ao fluido folicular. Entretanto, como esse fluido é formado no CL continua sendo desconhecido.

De acordo com Rodgers e Irving-Rodgers (2010) a hipótese central sobre a formação do fluido folicular sugere que a produção, por células da granulosa, de substâncias fortemente hidrofílicas gera um gradiente osmótico, por meio do qual a água é atraída para o antro folicular. Diante disso, Rizzo et al. (2016) afirmam que é possível que, como as grandes células luteais são derivadas das células da granulosa, pode ser que também ocorra esse mecanismo no CL e que substâncias semelhantes estejam presentes.

2. INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) em bovinos é uma biotecnologia reprodutiva amplamente utilizada, com o principal objetivo de maximizar a produção de descendentes geneticamente superiores por fêmea. Este processo é mais eficiente do que as práticas tradicionais de reprodução, como a inseminação artificial (IA), especialmente em relação à otimização da produção e à implementação de melhorias genéticas em um curto espaço de tempo (PAZZIM, 2021; PASA, 2008). Além de facilitar a geração de múltiplos embriões por ano a partir de uma única doadora, a TE permite uma utilização mais eficiente das doses de sêmen de touros selecionados, resultando em aumento da rentabilidade na cadeia produtiva (BARUSSELI et al., 2008).

Dentre as metodologias disponíveis para a produção de embriões bovinos, destacam-se a produção *in vivo*, mediante a indução de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOET), e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) (MERTON et al., 2003). No entanto, o sucesso dos programas de TE também está intimamente ligado à disponibilidade e adequação das receptoras para a inovulação (BARUSELLI, 2004).

A taxa de prenhez das receptoras é influenciada por uma variedade de fatores intrínsecos e extrínsecos. Fatores intrínsecos incluem a qualidade do corpo lúteo (CL), os níveis de progesterona, a sincronização entre doadora e receptora, protocolos de sincronização e a qualidade do embrião. Fatores extrínsecos englobam a nutrição, manejo, ambiente, raça e categoria animal (COSTA FILHO et al., 2013). A avaliação clínica dos ovários, realizada por palpação transretal, com a utilização de ultrassonografia, para confirmar a presença e a qualidade do CL, é fundamental na seleção das receptoras no dia da inovulação. O corpo lúteo é crucial, pois é responsável pela produção de progesterona (P4), a qual controla as alterações no ambiente uterino, influencia o desenvolvimento embrionário e mantém a gestação (REIS, 2006).

Os corpos lúteos podem ser classificados como protuso ou incluso; compacto (não-cavitários) ou cavitário (SENGER, 2003). Embora alguns estudos indiquem que não há diferenças na taxa de gestação relacionadas à morfologia do CL (MARQUES et al., 2002; BARREIROS et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2012), existem hesitações entre os profissionais veterinários acerca da qualidade dos CLs

cavitários, que muitas vezes resultam na exclusão dessas receptoras dos programas de TE. A ultrassonografia, ao possibilitar a visualização detalhada e mensuração das dimensões do CL, pode atenuar essa preocupação, visto que o tamanho do CL está relacionado à produção de P4, embora essa relação não seja sempre proporcional à taxa de gestação (COSTA FILHO et al., 2013).

O presente estudo teve como objetivo realizar uma análise ultrassonográfica dos parâmetros quantitativos do CL no dia da TE, no momento da inovulação, e seu papel na taxa de concepção.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.4. Animais e manejo reprodutivo

O experimento foi conduzido em cinco propriedades no estado de Mato Grosso do Sul, entre maio e setembro de 2024, envolvendo 264 fêmeas bovinas das raças Nelore, Girolando e ½ sangue Angus. As fêmeas foram categorizadas entre novilhas (n = 62) e pluríparas (n = 202). Todas as receptoras foram submetidas a protocolos de sincronização de ovulação. No dia 0, as fêmeas receberam dispositivo intravaginal de P4 (Sincrogest®, Ourofino, SP, Brasil) e 2 mg de BE IM (Sincrodiol®, Ourofino, SP, Brasil). No dia 9, foi retirado o dispositivo de P4 e aplicado 500µg de cloprostenol sódico IM (Sincrocio®, Ourofino, SP, Brazil) e 1 mg de cipionato de estradiol IM (E.C.P.®, Pfizer, SP, Brasil) e 300 UI de eCG IM (Novormon®, Intervet, SP, Brasil). A inovulação foi realizada 18 dias após o início do protocolo, garantindo a presença de um corpo lúteo funcional.

3.5. Classificação morfológica dos embriões

Os embriões transferidos foram classificados de acordo com sua morfologia em blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL) e blastocisto expandido (BX), utilizando

critérios padronizados conforme o Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS). A classificação morfológica considerou a simetria, o número de células e o grau de expansão do blastocisto. Apenas embriões que apresentaram classificação morfológica adequada foram transferidos a fresco, enquanto embriões classificados como mórula ou blastocisto eclodido foram excluídos do experimento.

3.6. Exames clínicos e ultrassonográficos

Exames clínicos reprodutivos e ultrassonográficos transretais dos ovários foram realizados em todas as receptoras no dia da transferência dos embriões. Apenas as fêmeas que apresentaram um CL funcional e um trato reprodutivo em condições adequadas foram consideradas aptas para a transferência.

Os exames ultrassonográficos foram realizados com um aparelho Mindray, modelo DP-20Vet, equipado com um transdutor linear transretal de 7,5 MHz. Os CLs visíveis na tela foram categorizados como compactos ou cavitários, e suas dimensões longitudinais e transversais foram registradas utilizando o painel de medição do equipamento. Nos CLs cavitários, tanto as dimensões da estrutura total quanto da cavidade foram medidas.

3.7. Medições do corpo lúteo

As medições foram realizadas em um CL de cada fêmea. Medidas longitudinais e transversais foram utilizadas para avaliar o diâmetro médio do corpo lúteo e da cavidade, quando presente (Figura 3). O diâmetro do tecido lúteo foi calculado para todos os CL, no CL compacto o resultado foi obtido a partir da média das medições longitudinais e transversais e, no CL cavitário, foi calculado a média da estrutura completa e da cavidade, para no final subtrair o diâmetro da cavidade e obter-se apenas o diâmetro correspondente o tecido lúteo.

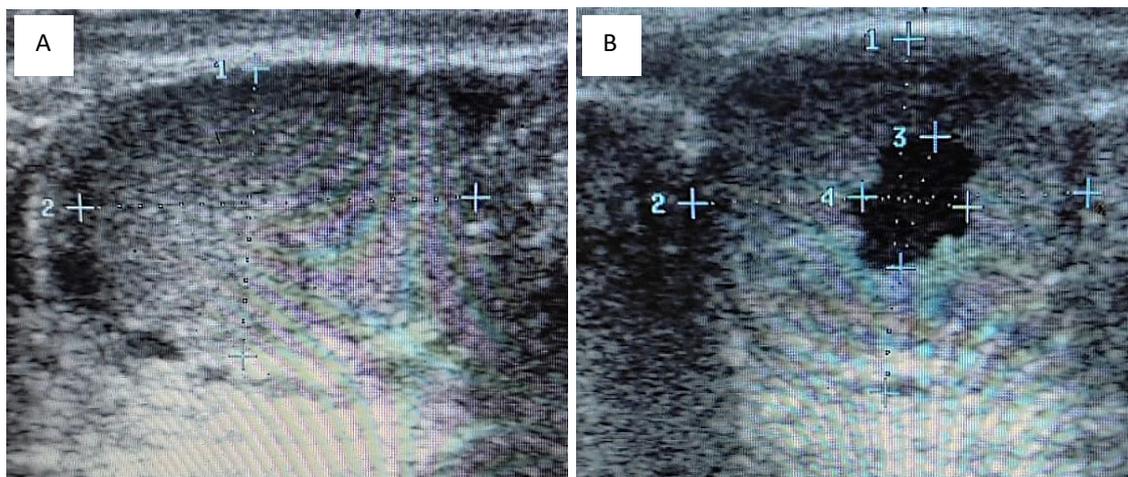


Figura 3. A) Corpo lúteo compacto; B) Corpo lúteo cavitário.

3.8. Procedimento de transferência de embriões

Os animais foram imobilizados no tronco de contenção em pé e submetidos a aplicação de 8g de Cloridrato de Lidocaína e 0,16g de Cloridrato de Xilazina (4ml de Bloc®) na região epidural. Os grupos foram inovulados com embriões à frescos (BI, BL ou BX), no qual foram transferidos aleatoriamente, independente da morfologia do corpo lúteo, seguindo a ordem de entrada no tronco de contenção.

A transferência foi realizada utilizando aplicador de embrião bovino, baina para TE juntamente com o plástico sanitário. O embrião foi inovulado no corno uterino adjacente ao ovário com o CL previamente diagnosticado. Todo o procedimento de inovulação do embrião foi realizado pelos profissionais da empresa MS Embryo Soluções em Pecuária.

3.9. Diagnóstico de gestação

Todas as fêmeas bovinas que receberam o embrião passaram por avaliação ultrassonográfica 25 a 40 dias após a inovulação para confirmação da prenhez

através da visualização da presença do concepto, constituído pelos envoltórios fetais e pelo embrião. A taxa de gestação foi calculada através da proporção de fêmeas prenhez para todas as receptoras de embriões aptas a inovulação.

3.10. Análise estatística

As análises foram realizadas no SAS (SAS Institute, Cary, NC). O procedimento PROC MEANS forneceu médias e erros padrão das variáveis contínuas, enquanto PROC CORR avaliou as correlações entre estas. Para modelar a taxa de prenhez (DG30), calculou-se medidas e erros padrões, correlação de Pearson para exploração das variáveis. Para verificar os efeitos das variáveis independentes sobre o tipo de CL, realizou-se análise de variância para medidas não paramétricas utilizando o procedimento GLIMMIX. Testes de comparação múltipla foram realizados com LSMEANS e ajuste de Tukey. Além disso, a regressão logística foi feita com PROC LOGISTIC, modelando DG30 em função de massa luteínica total e diâmetro do CL, gerando previsões de probabilidade e limites de confiança, visualizados com PROC SGPLOT. Os resultados foram considerados significativos com $P < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve efeito de categoria e raça nas variáveis morfológicas ovarianas e na concepção ($p > 0,05$). Em fêmeas bovinas receptoras de embrião, quando inovuladas oito dias após a remoção do dispositivo de P4, é observado uma maior incidência de CL compacto (74%; $p < 0,05$) com relação ao cavitário (26%). O presente estudo obteve a mesma proporção de CLs cavitários de outros estudos com 22,7% e 32,7% (Barreiros et al., 2006; Bartyomiej et al. (2021) inovulando-se com 7 ou 6-8 dias após o estro, respectivamente.

Fêmeas que possuíam, no momento da inovulação do embrião, CL cavitário apresentaram menor taxa de concepção (34%) que aquelas que possuíam CL compacto (46%; $p = 0,05$; Figura 4). Alguns autores verificaram taxa de prenhez

superior em CLs cavitário (BARREIROS et al., 2006; BARTYOMIEJ et al., 2021), porém trabalhando com novilhas taurinas. No presente estudo, a menor concepção em CLs cavitários pode ser justificada pela menor quantidade de tecido lúteo encontrado neste tipo morfológico (Figura 5). Considerando o tecido lúteo, apenas, e a probabilidade de prenhez, foi possível observar que maior estrutura lútea aumentou a chance de a receptora bovina ficar prenhe após a transferência de embriões em tempo fixo (TETF; Figura 6). Não foi observada relação entre diâmetro de CL e probabilidade de prenhez (Figura 7), uma vez que CLs cavitários, embora tenham maior diâmetro, apresentam menor quantidade de massa luteínica.

Nogueira et al. (2012) encontraram diferença significativa na taxa de prenhez de receptoras que apresentaram maior diâmetro de CL no momento da inovulação, quando comparadas àquelas não gestantes. Em um estudo realizado por Baruselli et al. (2003) verificou-se a existência de correlação entre a área do corpo lúteo com as concentrações plasmática de progesterona (P4) e os índices de prenhez. Corpos lúteos com área superior determinaram maior concentração plasmática de P4 e, como consequência, maior taxa de gestação. De acordo com Vasconcelos et al. (2001), corpos lúteos que possuem maior área secretam maiores quantidades de P4, o que pode ter efeito positivo no reconhecimento materno da gestação e, conseqüentemente, na taxa de prenhez. Por outro lado, alguns estudos demonstram que concentração plasmáticas de P4 independem do tipo morfológico do CL, (BORGES et al., 2003; BARREIROS et al., 2006).

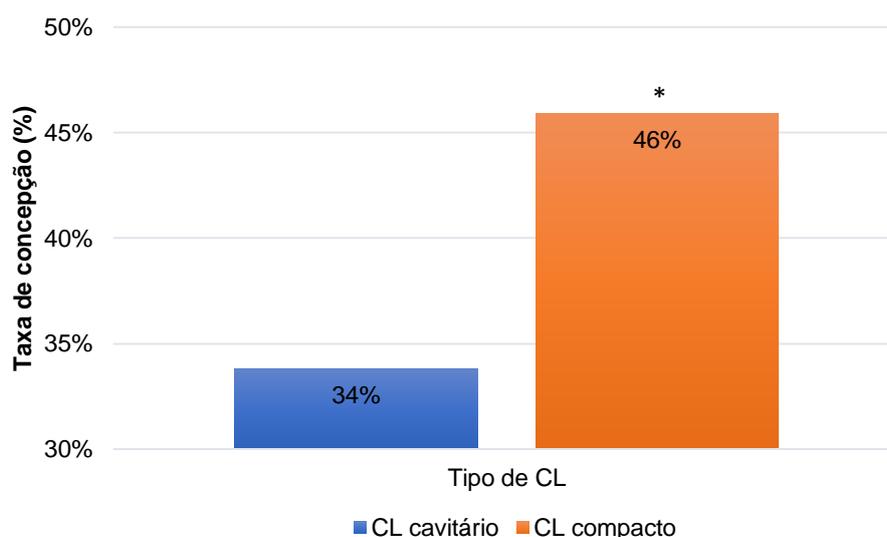


Figura 4. Taxa de concepção de receptoras bovinas de acordo com o tipo de corpo lúteo no momento da inovulação. * P = 0,05.

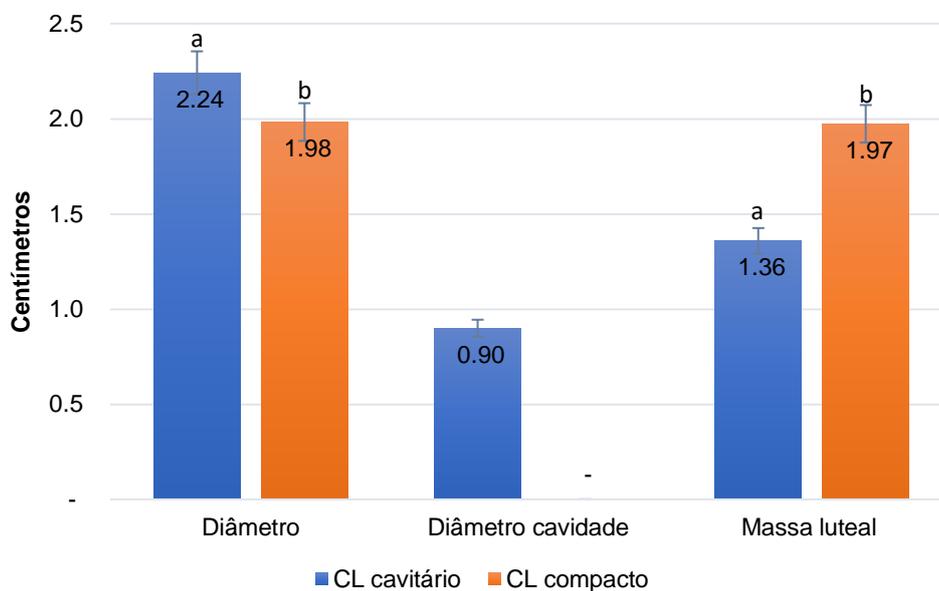


Figura 5. Medidas morfométricas de corpo lúteo compacto e cavitário com base no diâmetro. Letras diferentes para diâmetro e massa luteal indicam $p < .0001$.

Foi verificada correlação positiva ($r = 0,39$; $p < .0001$) entre diâmetro de CL e da massa luteínica, ou seja, quanto maior o CL maior é a massa luteínica. O cenário se repetiu para diâmetro do CL e da cavidade ($r = 0,4$; $p < .0001$), então se o diâmetro da cavidade aumenta o diâmetro do CL também é maior. No entanto, a correlação entre o diâmetro da cavidade e massa luteínica foi negativa ($r = -0,64$; $p < .0001$), indicando que quanto maior a cavidade, menor é a massa luteínica em CLs cavitários (Figura 8).

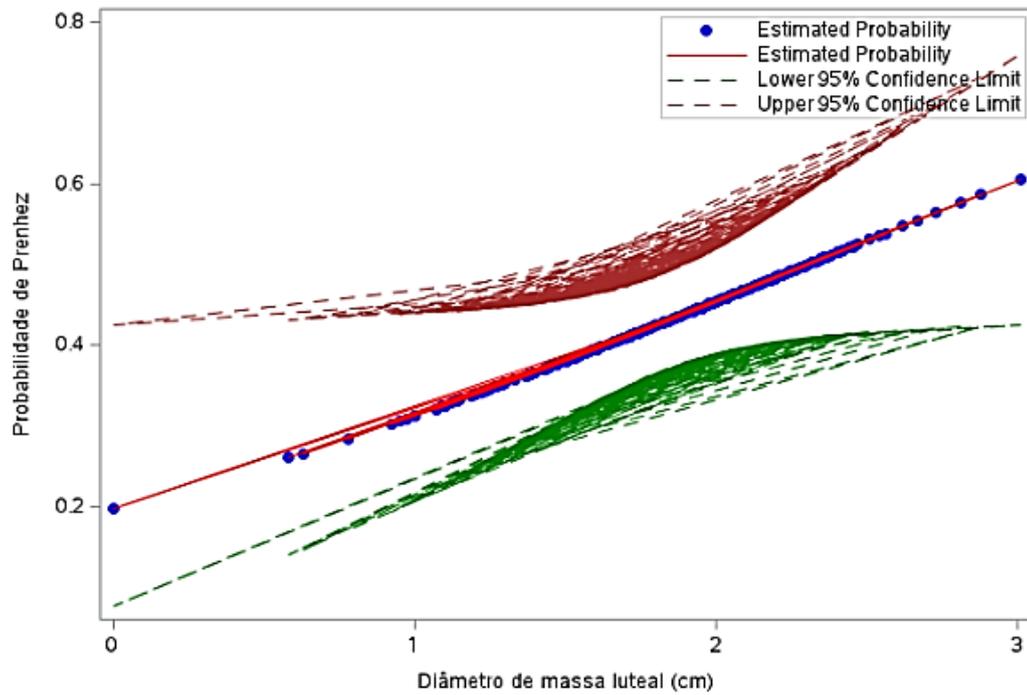


Figura 6. Relação entre o diâmetro da massa luteínica (cm) e a probabilidade de prenhez com intervalo de confiança. Fórmula da regressão: $\text{Probabilidade}(\text{DG30} = 1 \mid \text{massalut}) = 1 / (1 + \exp(-(-1.3957 + 0.6053 * \text{massalut})))$.

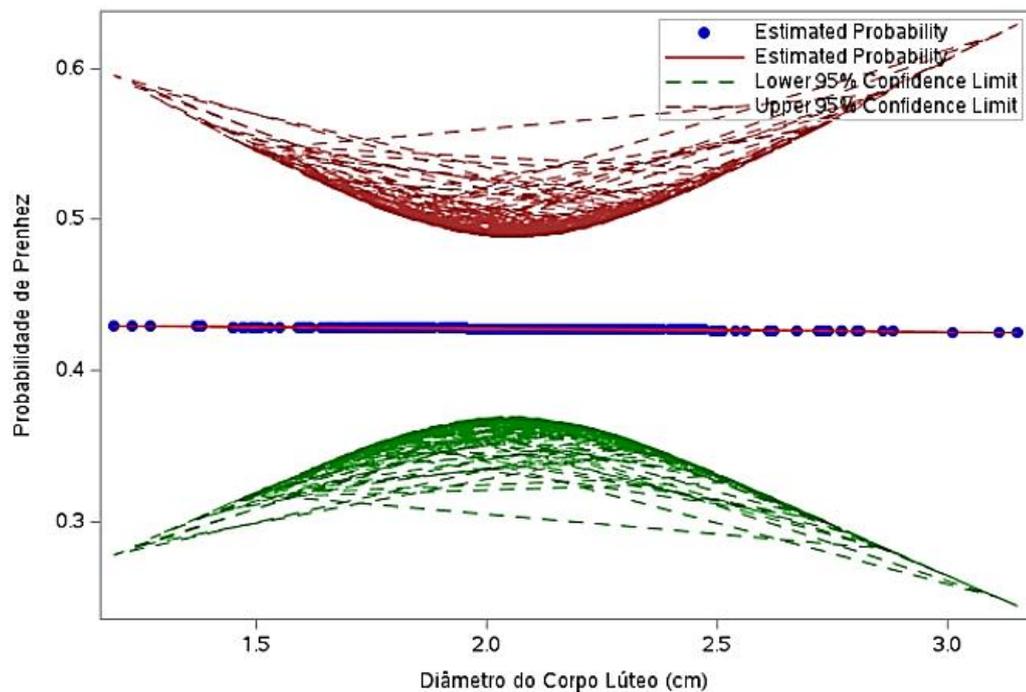


Figura 7. Relação entre diâmetro do corpo lúteo total, com ou sem cavidade, com a probabilidade de prenhez. Fórmula da regressão: $\text{Probabilidade}(\text{DG30} = 1 \mid \text{massalut}) = 1 / (1 + \exp(-(-1.3957 + 0.6053 * \text{massalut})))$.

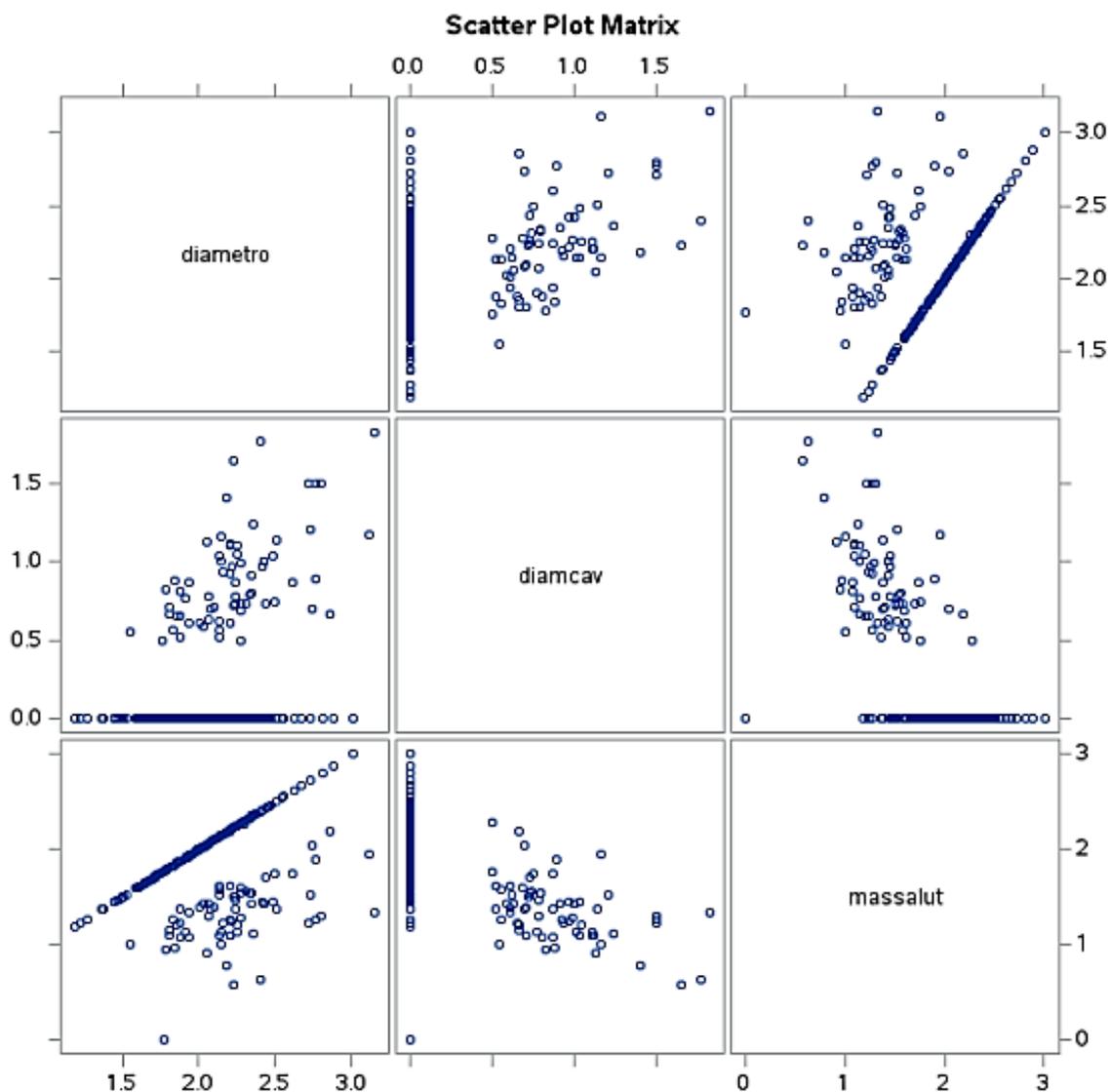


Figura 8. Gráfico de correlação das variáveis: diâmetro do CL (diametro), diâmetro da cavidade (diamcav) e massa luteal (massalut).

Embriões transferidos a fresco, classificados em blastocisto inicial (n=39), blastocisto (n=65) e blastocisto expandido (n=160), quando inovulados em doadoras que apresentaram CLs cavitários, resultaram em uma taxa de concepção semelhante para todas as classificações de embriões, não havendo diferença estatística ($P > 0,05$; Tabela 1). Em CLs compactos a concepção foi semelhante em embriões BL e BX, no entanto, quando utilizou-se embriões BI a taxa de concepção foi de 13% (Tabela 1).

Tabela 1. Taxas de concepção segundo o tipo de corpo lúteo e classificação morfológica dos embriões inovulados a fresco.

TCL e CEM	N° de animais	Taxa de concepção (%)
CA	68	34
BI	8	38 ^{ab}
BL	21	33 ^{ab}
BX	39	33 ^{ab}
CO	196	46
BI	31	13 ^b
BL	44	50 ^a
BX	121	53 ^a
Total Geral	264	43

TCL: tipo de corpo lúteo; CEM: classificação do embrião; CL: corpo lúteo; CA: CL cavitário; CO: CL compacto; BI: blastocisto inicial; BL: blastocisto; BX: blastocisto expandido. Letras diferentes para taxa de concepção indicam $p < 0,05$.

A taxa de concepção inferior de BI inovulados em receptoras com CL compacto pode ser devido ao CL cavitário ser mais jovem e provindo de uma ovulação tardia, estando ainda em ativo processo de luteinização, com o fechamento da cavidade para obter-se uma estrutura compacta. Já o CL compacto seria uma estrutura mais madura, que já concluiu seu desenvolvimento, portanto expondo a fêmea por mais tempo a hormônios como P4 e PGE2 (NIRINGIYUMUKIZA et al., 2018), assim como outros fatores de crescimento locais, promovendo um status diferente de circuitaria cerebral e ambiente uterino. Deste modo, fêmeas que ovularam mais cedo terão o embrião em desenvolvimento mais avançado do que aquelas que ovularam depois. Assim, pode ser que a utilização de BI em receptoras com CL compacto apresentem menores taxa de concepção, em razão de estarem em assincronia quanto ao seu desenvolvimento. Neste cenário, esperava-se encontrar maior taxa de concepção utilizando embriões BI em CLs cavitários, e, embora numericamente apenas tenha havido uma maior de concepção (38%) quando comparada com BL e BX ambos com 33%, não observou-se diferença estatística devido ao número de receptoras com CA/BI ter sido baixo (n = 8; Tabela 1).

Nesse experimento foi verificado que a maior parte das ovulações ocorreram no ovário direito (64%; $p < 0,05$; Figura 9), corroborando com o resultado encontrado por Karamishabankareh et al. (2015), com 60,9% de ovulações no ovário direito. Tal cenário pode ser justificado pela relação com a intensidade de fluxo sanguíneo no órgão, que é menor no ovário esquerdo do bovino devido à compressão do rúmen (ROY, 1983). Os CLs presentes no ovário esquerdo apresentaram maior diâmetro de massa luteal (1.85 cm; $p < 0,05$) e taxa de concepção superior (48%; $p < 0,05$) quando comparados aos CLs do lado direito, o que está de acordo com os resultados obtidos na figura 6 e já discutidos anteriormente.

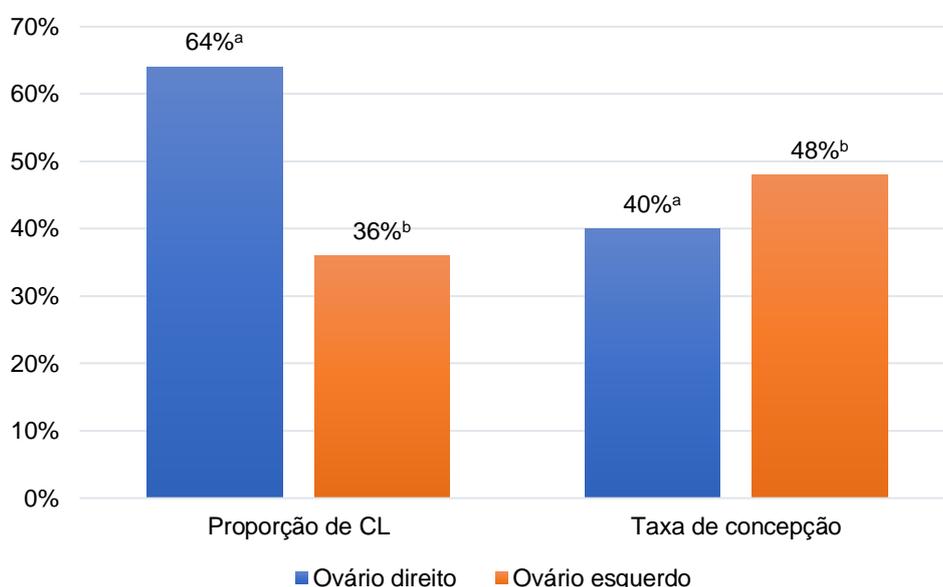


Figura 9. Proporção de CL e taxa de concepção relacionadas com o lado do ovário correspondente. (^{ab} $p < 0,05$).

5. CONCLUSÃO

Embora o CL compacto apresente menor diâmetro, ele possui maior tecido luteinizado e, com essas fêmeas, obtendo maior taxa de concepção. O maior número de ovulações ocorre no ovário direito, porém a maior concepção é observada no ovário esquerdo. Fêmeas com CL compacto obtêm menor concepção quando recebem embriões classificados como blastocisto inicial.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARREIROS, T. R. R.; BLASCHI, W.; BORSATO, E. A.; LUDWIG, H. E.; SILVA, D. R. M.; SENEDA, M. M. S. **Comparação das taxas de prenhez entre receptoras com corpos lúteos cavitários ou compactos após protocolo de sincronização com cloprostenol ou transferência de embriões em tempo fixo.** Semin: Ciências Agrárias, Londrina, v. 27, n. 4, p. 657-664, out./dez. 2006.

BARTYOMIEJ, M. J. et al. **Ultrasound Characteristics of the Cavitary Corpus Luteum after Oestrus Synchronization in Heifers in Relation to the Results of Embryo Transfer.** Animals, v. 11, n. 6, p. 1706, 7 jun. 2021.

BARUSELLI, P. S. et al. **Aumento da taxa de prenhez em receptoras de embrião bovino pela utilização do protocolo “ovsynch” com inovulação em tempo fixo.** Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, Porto Alegre, v. 28, p. 218, 2003.

BARUSELLI, P.S., MARQUES, M.O., CARVALHO, N.A.T., BERBER, R.C.A., VALENTIM, R., CARVALHO FILHO, A.F., COSTA NETO, W.P. 2003. **Dinâmica folicular e taxa de prenhez em novilhas receptoras de embrião (Bos taurus indicus x Bos taurus taurus) tratadas com o protocolo "Ovsynch" para inovulação em tempo fixo.** Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science 40(supl):96-106.

BARUSSELI, P. S. et al. **Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo.** Biotecnologia de reprodução em bovinos (3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada). 2008. Disponível em: . Acesso em: 05 de set. 2021.

BERTAN, C. M.; BINELLI, M. et al. **Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise: revisão de literatura.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 43, n. 6, p. 824, 1 dez. 2006.

BINELLI, M. et al. **Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle.** Theriogenology, v. 56, n. 9, p. 1451-1463, 2001.

BORGES, A. M. et al. **Desenvolvimento luteal e concentrações plasmáticas de progesterona em vacas das raças Gir e Nelore.** 2003. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 32, n. 2, p. 276–283, abr. 2003.

CARVALHO, V.H.S. et al. **Impactos das biotécnicas da reprodução animal e o melhoramento genético na pecuária de corte.** PUBVET, São Luis De Montes Belos, v.17, n.8, p.1-10, 2023.

COSTA E SILVA, E. V. et al. **Efeito do manejo e de variáveis bioclimáticas sobre a taxa de gestação em vacas receptoras de embrião**. Ciência Animal Brasileira, Goiânia, v. 11, n. 2, p. 280-291, 2010.

COSTA FILHO, L. C. C. da; QUEIROZ, V. L. D.; ROSA, L. S. da; ZÚCCARI, C. E. S. N.; COSTA e SILVA, E. V. da. **Fatores que interferem na eficiência reprodutiva de receptoras de embrião bovino**. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, v. 16, n. 2, p. 201-208, jul./dez. 2013.

COSTA, E. P. et al. **Uso da rbST no dia do estro em receptoras de embrião bovino criopreservados**. Ciência Animal Brasileira, v. 12, n. 4, 21 dez. 2011.

FUCK, E. J. et al. **Uso da gonadotrofina coriônica equina em receptoras de embrião para avaliar o incremento da progesterona endógena no dia da inovulação e sua correlação com a taxa de prenhez**. Acta Scientiarum, Maringá, v. 24, n. 4, p.1119-1126, 2002.

GINTHER, O. J. **Selection of side of ovulation by intraovarianism in Bos taurus heifers**. Biology of Reproduction, v. 103, n. 4, p. 711–716, 13 jul. 2020.

GULARTE, F. D. A. et al. **Corpo lúteo cavitário em ovário bovino - relato de caso**. Revista Agraria Academica, v. 2, n. 4, p. 249–253, 1 jul. 2019.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ. **Reprodução animal** / [coordenador de tradução da 7. ed. original Renato Campanarut Barnabe]. – Barueri, SP : Manole, 2004.

JONES, A.; LAMB, G. **Nutrition, synchronization, and management of beef embryo transfer recipients**. Theriogenology, v. 69, n. 1, p. 107-115, 2008.

KARAMISHABANKAREH, H. et al. **In vivo and in vitro study of the function of the left and right bovine ovaries**. Theriogenology, v. 84, n. 5, p. 724–31, Autumn 2015.

LEAL, L. S.; OBA, E.; FERNANDES, C. A. C. & FILHO, O. G. S. **Avaliação do corpo lúteo, contratilidade uterina e concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol em receptoras de embriões bovinos**. Ciência Animal Brasileira, v. 10, n. 1, p. 174-183, jan./mar. 2009.

LIMA, J.M.P.; SANTOS, F.A.; PIMENTEL, M.M.L.; BEZERRA, M.B. **Progresso metodológico e sua influência na produção in vitro de embriões bovinos no Brasil**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.38, n.3, p.135-140, 2014.

MARQUES, M. O. et al. **Efeito da cavidade do corpo lúteo na concentração plasmática de progesterona em novilhas Bos taurus x Bos indicus receptoras de embrião**. Revista Brasileira de reprodução Animal, Belo Horizonte, v. 26, p. 238-240, 2002.

MEMBRIVE, C. M. B.; et al. **Formação do corpo lúteo, luteólise e reconhecimento materno da prenhez**. In. LUZ, M. R.; CELEGHINI, E. C. C.;

BRANDÃO, F. Z. Reprodução animal: bovinos, caprinos e ovinos. 1ed, vol2, Santana de Paraíba/Brasil: Manole. 2024. p. 46-64.

MERTON, J. S.; ROOS, A. P. W.; MULLAART, E.; RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J. **Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry.** Theriogenology, Stoneham, v.59, n.2, p.651-674, jan. 2003.

NIRINGIYUMUKIZA, J. D.; CAI, H.; XIANG, W. **Prostaglandin E2 involvement in mammalian female fertility: ovulation, fertilization, embryo development and early implantation.** Reprod Biol Endocrinol. 2018 May 1;16(1):43.

NOGUEIRA, E. et al. **Effect of breed and corpus luteum on pregnancy rate of bovine embryo recipients.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 41, n. 9, p. 2129-2133, 2012.

OEMBRIÃO. **Estatísticas da produção e transferência de embriões em 2022: dinâmica e tendências do mercado brasileiro de embriões.** 2023. O grande encontro da IATF artigo técnico. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://ppgcianimal.ufms.br/files/2023/12/Jornal-O-Embriao-Ed.-72-2.pdf>> Acesso em: 2 nov. 2024.

OYUELA, L. A.; JIMENEZ, C. **Factores que afectan la tasa de preñes em programas de transferencia de embriones.** Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 57, p. 191-200, 2010.

PASA, C. **Transferência de embriões em bovinos.** Biodiversidade, v. 7, n. 1, 2008.

PAZZIM, L.V.L. **Transferência de embriões em bovinos: Revisão de literatura.** Monografia (Trabalho conclusão de curso) - Universidade federal de Santa Catarina. Curitibanos, 2021.

PIETERSE, M.C.; KAPPEN, K.A.; KRUIP, Th.A.M.; TAVERNE, M.A.M. **Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries.** Theriogenology, v.30, n.4, p.751-762, 1988.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. **Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality.** Reprod. Domest. Anim., v. 43, Suppl. 4, p. 44-50, 2008.

RIZZO, A. et al. **Dynamics of the progesterone and cholesterol concentrations within the bovine corpus luteum cavity.** Research in Veterinary Science, v. 109, p. 56–58, 25 ago. 2016.

RODGERS, R.J., IRVING-RODGERS, H.F., 2010. **Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid.** Biol. Reprod. 82 (6), 1021–1029.

ROY, L.A. **How the ovary works.** Dairy ilerd Manage 20(2)30-2,1983.

RUMBIN. **Twenty years history of the Brazilian Embryo Technology Society (1985-2005)**. Acta Sci Vet, v.33, p.35-54, 2005.

SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M. M. **Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina**. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 39, p. 422-432, 2010.

SEIDEL, G.E.J.; SEIDEL, S. M. **Training manual for embryo transfer in cattle 2005**.

SENGER, P.L. **Reproductive cyclicity: the follicular fase**. In: SENGER, P.L. Pathways to pregnancy and parturition. 2nd ed. USA: Current Conception, 2003. cap.8, p.164-187.

SILVA, R. G.; MORAIS, P. A. E. F.; GUILHERMINO, M. M. **Evaluation of thermal stress indexes for dairy cows in tropical regions**. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 36, n. 4, p. 1192-1198, 2006.

SIRARD, M.A.; PARRISH, J.J.; WARE, C.B.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; FIRST, N.L. **The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos**. Biology of Reproduction, v.39, n.3, p.546-552, 1988.

VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M. et al. **Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos**. Molecular Reproduction and Development, v.51, n.1, p.53-58, 1998.

VASCONCELOS, J.L. M., SARTORI, R., OLIVEIRA, H.N., GUENTHER, J.G., WILTBANK, M.C. 2001. **Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate**. Theriogenology, v. 56, n. 2, p. 307–314, jul. 2001.

VIANA, J. H. M. et al. **Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: A new milestone has been reached: Transfers of IVP embryos were over one million worldwide**. Embryo Technology. Newsletter, v. 40, n. 4, p. 1-19, 2022.