

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal

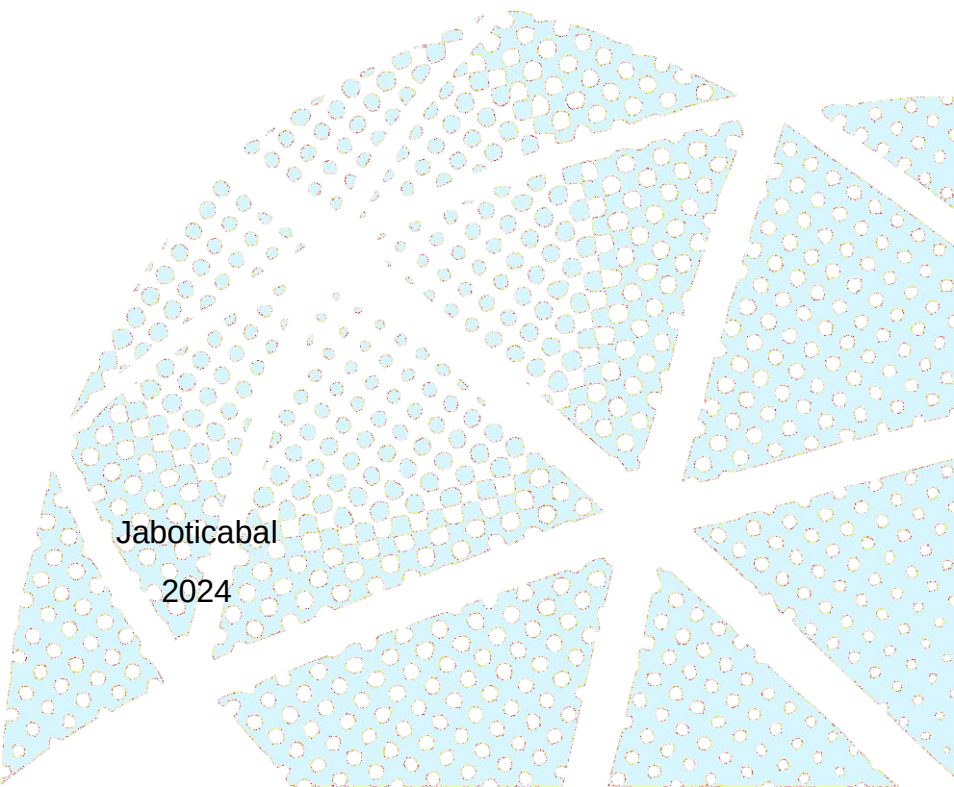
MAYARA PAULA PAGLIONE

**RELATÓRIO FINAL DO ESTÁGIO CURRICULAR EM PRÁTICA VETERINÁRIA,
REALIZADO JUNTO AO LABORATÓRIO DE MORFOFISIOLOGIA
MOLECULAR E DESENVOLVIMENTO EM PIRASSUNUNGA-SP, À
ZEBUEMBRYO AGROPECUÁRIA S.A. EM DELTA-MG E À GENEAL GENÉTICA
E BIOTECNOLOGIA ANIMAL EM UBERABA–MG.**

Caso de interesse: Aplicação de FSH recombinante (ZIMBRIA®) em doadoras da
raça Nelore.

Jaboticabal

2024



MAYARA PAULA PAGLIONE

**RELATÓRIO FINAL DO ESTÁGIO CURRICULAR EM PRÁTICA VETERINÁRIA,
REALIZADO JUNTO AO LABORATÓRIO DE MORFOFISIOLOGIA
MOLECULAR E DESENVOLVIMENTO EM PIRASSUNUNGA-SP, À
ZEBUEMBRYO AGROPECUÁRIA S.A. EM DELTA-MG E À GENEAL GENÉTICA
E BIOTECNOLOGIA ANIMAL EM UBERABA-MG.**

Caso de interesse: Aplicação de FSH recombinante (ZIMBRIA®) em doadoras da raça Nelore.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para
obtenção do título de bacharel em
Medicina Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Lindsay Unno
Gimenes

Supervisores:

Prof. Dr. Felipe Perecin

Me. Hebert Valério Filho

Dr. Rodrigo Bohrer

Jaboticabal - SP

2024

P138r

Paglione, Mayara Paula

Relatório final do estágio curricular em prática veterinária, realizado junto ao Laboratório De Morfofisiologia Molecular E Desenvolvimento em Pirassununga-SP, à Zebuembryo Agropecuária S.A. em Delta-MG e à Geneal Genética E Biotecnologia Animal em Uberaba-MG : Caso de interesse: Aplicação de FSH recombinante (ZIMBRIA®) em doadoras da raça Nelore. / Mayara Paula Paglione. -- Jaboticabal, 2024
49 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Lindsay Unno Gimenes

1. Superovulação. 2. Bovinos. 3. FSH. 4. Reprodução Animal. I. Título.

MAYARA PAULA PAGLIONE

**RELATÓRIO FINAL DO ESTÁGIO CURRICULAR EM PRÁTICA VETERINÁRIA,
REALIZADO JUNTO AO LABORATÓRIO DE MORFOFISIOLOGIA MOLECULAR E
DESENVOLVIMENTO EM PIRASSUNUNGA-SP, À ZEBUEMBRYO AGROPECUÁRIA S.A.
EM DELTA-MG E À GENEAL GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA ANIMAL EM UBERABA-
MG.**

Caso de interesse: Aplicação de FSH recombinante (ZIMBRIA®) em doadoras da raça Nelore.

Relatório de Estágio Curricular em Prática Veterinária apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes

Área de Concentração: Reprodução de bovinos

Data da defesa: 10/12/2024

☒ Aprovado

☐ Reprovado

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **LINDSAY UNNO GIMENES**
Data: 13/12/2024 14:29:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes

UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **ANGELO ESTEVAO SANT ANNA DONADON**
Data: 13/12/2024 15:06:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Me. Angelo Estevão Sant'Anna Donadon

UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **GUILHERME FAZAN ROSSI**
Data: 13/12/2024 22:06:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Guilherme Fazan Rossi

Documento assinado digitalmente
 **PAOLA CASTRO MORAES**
Data: 14/12/2024 08:34:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
CEGRA

*Dedico todo e qualquer sucesso
meu aos meus pais, que sob
muito sol, me fizeram chegar até
aqui pela sombra e com água
fresca.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus, por me guiar e proporcionar oportunidades valiosas ao longo da minha trajetória na universidade. Agradeço também aos meus pais, Maria da Graça e Marcos, que são meus maiores exemplos de amor. Sempre se dedicaram para me oferecer a melhor educação e nunca mediram esforços para me apoiar, mesmo longe de casa. Aos meus avós, Alice, Nadir e Vital, que são uma fonte de sabedoria e respeito e à minha irmã, Mariana, que sempre me incentivou a seguir meus sonhos.

Aos meus amigos do B.O., que estiveram ao meu lado em estudos madrugada adentro, em risadas no cantiosque, nas festas e inters, nas jantinhas, nos congressos, nas sessões de cinema e TikTok, e até em acidentes de trânsito. Agradeço por cada momento de apoio e pelas boas risadas que compartilhamos.

Aos integrantes da Liga Acadêmica de Saúde Pública Veterinária e à coordenadora, Professora Doutora Adolorata Aparecida Bianco Carvalho, que contribuíram imensamente para meu aprendizado pessoal e acadêmico. Durante minha participação, tiveram um papel fundamental em me ensinar a trabalhar em equipe, superar a timidez e criar grandes amizades.

À Professora Doutora Paola Castro Moraes e às minhas coorientadoras, Pamela e Mareliza, pela oportunidade e pelo apoio concedidos durante minha iniciação científica. Este período foi de extrema importância para o desenvolvimento do meu pensamento crítico e da minha escrita científica.

Agradeço também aos meus supervisores e a todos os profissionais que se dedicaram a me orientar e ensinar durante meus estágios, sempre com respeito e paciência. Por fim, sou grata aos membros da minha banca, Angelo Donadon e Guilherme Rossi, e à Professora Doutora Lindsay Unno Gimenes, que me acolheu como sua orientanda e me auxiliou inúmeras vezes durante minha trajetória.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A. Vista frontal do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD). B/C. Imagens do interior do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD)	11
Figura 2 - Ambientes destinados à produção <i>in vitro</i> de embriões. A. Sala de aspiração folicular. B. Incubadora de alto O ₂ . C. Fluxo laminar. D. Incubadora de baixo O ₂ .	12
Figura 3 – A. QuantStudio6. B. Termociclador. C. Bancada destinada à técnica de qPCR. D. Centrífuga Universal 32 R. E. Freezers -80°C. F. Sistema Mili-Q. G. Autoclave. H. NanoSight	13
Figura 4 – A. Sala destinada à análise celular com Microscopy Imaging for Cellular Analysis (MICA). B. Citômetro de fluxo.	13
Figura 5 – Mapa dos países que a Zebuembryo Agropecuária S.A. exporta material genético.	14
Figura 6 – Representação esquemática da fazenda.	15
Figura 7 – A. Tronco de contenção da área de exportação. B. Balança. C. Zona de descontaminação. D. Tronco de contenção da área nacional. E. Sala de medicamentos. F. Seringa.	16
Figura 8 – A. Entrada das baias. B. Baia individual com animais. C. Sala de ordenha. D. Tanque de armazenamento do leite.	16
Figura 9 – A. Sala de armazenamento de sêmen e embriões. B. Fluxo laminar do laboratório. C. Máquina de congelação de embrião. D. Estufa de baixa tensão de O ₂ do laboratório.	17
Figura 10 – A. Imagem de lupa esteromicroscópica para seleção de diversos graus de oócitos. B. Fluido folicular após centrifugação por 5 minutos.	19
Figura 11 – A. Fita EstroTECT. B. Medição de espessura do endométrio realizada no ultrassom.	21
Figura 12 – Medição de folículo dominante no ultrassom.	21
Figura 13 – A. Imagem vista de cima do aparelho reprodutivo feminino, evidenciando a cérvix, colo e corpo de útero e ovários. B e C. Imagem de colheitas de fluido uterino e ovidutal, respectivamente.	22
Figura 14 – A. Imagem vista de cima do aparelho reprodutivo masculino, evidenciando o epidídimo e o testículo. B. Imagem da máquina de congelação e o botijão de nitrogênio.	23
Figura 15 – A. Equipe de palestrantes do seminário na FAZU. B. Ambiente destinado a aula prática na FAZU.	24

Figura 16 – A. Cutímetro Walmur. B. Medição da espessura de pele anterior à aplicação da tuberculina. C. Aplicação da tuberculina bovina via intradérmica.	25
Figura 17 – A. Tubos de colheita a vácuo para o exame de brucelose. B. Coleta de sangue realizada na veia coccígea.	26
Figura 18 – A. Envase de palhetas de embriões para DT. B. Imagem microscópica de blastocistos expandidos no D7. C. Palheta de sêmen imersa em nitrogênio.	26
Figura 19 – A. Dispositivo de progesterona utilizado na IATF (Prociclar®). B. Medicamentos injetáveis utilizados na IATF (Sincrocio® e Sincrodiol®).	27
Figura 20 – Representação gráfica da quantidade de animais aspirados por raça durante o período de Estágio Curricular em Prática Veterinária na Zebuembryo Agropecuária S.A.	28
Figura 21 – A. Imagem da tela do ultrassom no momento da OPU. B. Imagem vista de cima dos aparelhos necessários para OPU, enfatizando o ultrassom, a bomba de vácuo, a guia de aspiração, as luvas de palpação, entre outros.	28
Figura 22 – A. Transportador de embriões a 37°C. B. Imagem dos equipamentos necessários para a TE, ressaltando a bacia, camisinha sanitária, transportador de embriões e inovulador. C. Estagiária realizando exame de palpação retal em fêmeas da raça Gir.	29
Figura 23 – Imagem dos medicamentos utilizados no protocolo junto com a ficha de controle dos animais.	29
Figura 24 – Representação gráfica da porcentagem de animais com patologias congênitas (n = 4) durante o período de Estágio Curricular em Prática Veterinária na Geneal Genética e Biotecnologia Animal.	33
Figura 25 – A. Dispositivo intravaginal Ferticare® 600. B. Estagiária Mayara Paglione realizando a administração de Ciosin® nas vacas do protocolo de SOV.	41
Figura 26 – A. Imagem vista de cima dos aparelhos necessários para IA, acentuando o descongelador de sêmen, os inoculadores e as bainhas, entre outros. B. Muco cervical ressaltando os sinais de estro.	41
Figura 27 – A. Ovário esquerdo de vaca superovulada com a presença de corpo lúteo (CL) com aspecto ecogênico. B. Ovário direito de vaca superovulada, com a presença de corpo lúteo com aspecto ecogênico.	42

Figura 28 – A. Procedimento de transferência de embriões realizado pela equipe da GeraEmbryo **B.** Copo coletor junto ao filtro. **C.** Sonda de Foley inflada. 43

Figura 29 – A. A. Mesa aquecedora com os meios de manutenção e lavagem. **B.** Embriões de descarte. **C.** Microscópio Esteromicroscópio e mesa aquecedora. 44

Figura 30 – A. Meio Holding Plus® e Crioprotetor e etilenoglicol. **B.** Criopreservação por Direct Transfer (DT). 44

LISTA DE TABELAS

	18
Tabela 1. Quantificação das rotinas acompanhadas no LMMD-FZEA, durante a realização do Estágio Curricular em Prática Veterinária.	
Tabela 2. Quantificação das rotinas acompanhadas na Zebuembryo Agropecuária S.A, durante a realização do Estágio Curricular em Prática Veterinária.	23
Tabela 3. Quantificação das rotinas de manejo reprodutivo durante a realização do Estágio Curricular em Prática Veterinária na Geneal Genética e Biotecnologia Animal.	30
Tabela 4 - Classificação da transferência de imunidade passiva (TIP) através do refratômetro.	31
Tabela 5 - Intervalos dos parâmetros vitais classificados como excelente ou bom em bezerros e neonatos.	32
Tabela 6. Quantidade de embriões congelados e corpos lúteos (CLs) formados no mês de agosto de 2024.	40
Tabela 7. Médias na produção de embriões <i>in vivo</i> com diferentes formulações de FSH (Pluset® e Zimbria®).	45
Tabela 8. Médias de corpos lúteos (CLs) com diferentes formulações de FSH (Pluset® e Zimbria®).	46
Tabela 9. Comparação das taxas de fecundação com diferentes medicamentos (Pluset® e Zimbria®).	46

SUMÁRIO

I.	RELATÓRIO DE ESTÁGIO	10
1.	INTRODUÇÃO	10
2.	DESCRIÇÃO DOS LOCAIS DE ESTÁGIO	11
2.1	Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da USP.	11
2.2	Zebuembryo Agropecuária S.A.	14
2.3	Geneal Genética e Biotecnologia Animal	17
3.	DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES	18
3.1	Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da USP.	18
3.2	Zebuembryo Agropecuária S.A.	23
3.3	Geneal Genética e Biotecnologia Animal	30
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
II.	MONOGRAFIA: APLICAÇÃO DE FSH RECOMBINANTE (ZIMBRIA®) EM DOADORAS DA RAÇA NELORE	34
1.	INTRODUÇÃO	34
2.	REVISÃO DE LITERATURA	35
2.1	Dinâmica Folicular	35
2.2	Superovulação	36
2.4	Colheita e seleção de embriões	37
2.4	Seleção de doadoras	38
2.5	Seleção de receptoras	38
3.	RELATO DE CASO	39
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

I. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

1. INTRODUÇÃO

As biotecnologias reprodutivas, como a inseminação artificial, a produção de embriões *in vivo* e *in vitro*, e a criopreservação de gametas, permitem o aumento da eficiência reprodutiva em animais domésticos, com isso, desempenham um papel fundamental na pecuária ao ultrapassar obstáculos naturais que limitam o sucesso reprodutivo e, quando são eficazes, seus custos justificam sua implementação (BINYAMEEN et al., 2019; GALLI et al, 2003). Essas tecnologias têm um impacto significativo nas taxas de produtividade de um rebanho, visto que tem como foco principal maximizar o número de animais geneticamente superiores e disseminar seu material genético (CHOUDHARY et al., 2016; GALLI et al, 2003; LONERGAN et al, 2007). Com isso, para o avanço do melhoramento genético se faz necessário a contribuição de pesquisas científicas e, por conseguinte, é imperativo que os profissionais da agropecuária se dediquem à prática e ao aprofundamento dessas biotécnicas.

O presente trabalho relata as atividades desenvolvidas pela discente durante o estágio curricular em prática veterinária no décimo semestre do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Jaboticabal, SP, sob orientação da Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes. Os locais de predileção foram aqueles alinhados com o objetivo de possibilitar à estagiária aprimorar e consolidar os conhecimentos teórico-práticos até então adquiridos, prover novas experiências, além de fomentar o desenvolvimento de habilidades para a prática profissional e expandir a rede de contatos com os profissionais estabelecidos no mercado da reprodução bovina.

No período de 07 a 30 de agosto de 2024, perfazendo um total de 144 horas, o estágio curricular foi realizado no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), campus de Pirassununga, SP. O grupo desenvolve pesquisas na área de Biologia do Desenvolvimento, Biologia da Reprodução e Biotecnologias Reprodutivas em animais domésticos.

Já no período de 02 de setembro a 04 de outubro de 2024, perfazendo um

total de 200 horas, foi realizado estágio na Zebuembryo Agropecuária S.A, Delta, MG. A empresa é uma Central de Doadoras com foco na produção de embriões para venda nacional e internacional. Por fim, no período de 07 de outubro a 22 de novembro de 2024, perfazendo um total de 280 horas, foi cumprido estágio na Geneal Genética e Biotecnologia Animal - Análise, pesquisa e laboratório S.A, Uberaba, MG. A empresa tem foco em melhoramento genético através da clonagem animal, banco genético e fertilização *in vitro* (FIV).

2. DESCRIÇÃO DOS LOCAIS DE ESTÁGIO

2.1 Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da USP.

O Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento está localizado na cidade de Pirassununga – SP, na Rua Duque de Caxias – Norte, 225 (**Figura 1**). Fundado nos anos 2000 pelo Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles, o LMMD se dedica atualmente a pesquisas nas áreas de biologia celular e do desenvolvimento, reprodução e biotecnologia reprodutiva. Seus principais focos de estudo incluem herança citoplasmática, desenvolvimento embrionário bovino, reprogramação nuclear por transferência de núcleo ou indução de pluripotência, o controle molecular da oogênese e da interação cumulus-oocitária, o metabolismo de gametas e embriões, e os mecanismos de comunicação no trato reprodutivo mediados por vesículas extracelulares.

Figura 1 – **A.** Vista frontal do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD). **B/C.** Imagens do interior do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD)



Fonte: Acervo pessoal (2024).

A equipe é composta por pesquisadores/professores, uma especialista de laboratório e pós-graduandos, que atuam realizando suas respectivas linhas de pesquisa e orientando os demais discentes da FZEA-USP e estagiários.

O laboratório oferece uma ampla gama de serviços, incluindo testes de DNA, PCR array para RNA mensageiros e microRNAs, produção *in vitro* de embriões (PIVE), e ensaios para detecção proteica, além de atividades relacionadas ao cultivo celular, embrionário e biologia molecular. A infraestrutura é bem equipada e inclui uma sala de estudos, dois banheiros, uma copa e uma sala de reunião, projetada para fornecer assistência à equipe.

O laboratório conta uma área destinada à PIVE composta por incubadoras de baixa e alta tensão de O₂, microscópio, lupa e fluxos laminares, há também um espaço específico para aspiração folicular de ovários provenientes de abatedouros (**Figura 2**). Além de um ambiente com várias bancadas, cada uma dedicada a uma técnica distinta, permitindo uma abordagem eficiente para diversas análises biológicas.

Figura 2 - Ambientes destinados à produção *in vitro* de embriões. **A.** Sala de aspiração folicular. **B.** Incubadora de alto O₂. **C.** Fluxo laminar. **D.** Incubadora de baixo O₂.



Fonte: Acervo pessoal (2024).

Tal ambiente está equipado com termocicladores e QuantStudio6 para PCR em tempo real (qPCR), geladeiras e freezers a -80°C para a manutenção das amostras biológicas e diversos outros equipamentos necessários para a elaboração de pesquisas com biologia molecular, como minispin, autoclaves, centrífugas, sistema Milli-Q, espectrofotômetro NanoDrop e NanoSight, entre outros aparelhos e materiais (**Figura 3**).

Figura 3 – A. QuantStudio6. **B.** Termociclador. **C.** Bancada destinada à técnica de qPCR. **D.** Centrífuga Universal 32 R. **E.** Freezers -80°C. **F.** Sistema Milli-Q. **G.** Autoclave. **H.** NanoSight.



Fonte: Acervo pessoal (2024).

Além disso, o laboratório possui uma sala especializada para análise celular com microscópios de fluorescência e confocalidade, e outra equipada com um citômetro de fluxo para análise e separação celular (**Figura 4**). Durante o período do estágio, o laboratório principal estava em reforma e a descrição apresentada refere-se à estrutura do laboratório reserva.

Figura 4 – A. Sala destinada à análise celular com Microscopy Imaging for Cellular Analysis (MICA). **B.** Citômetro de fluxo.



Fonte: Acervo pessoal (2024).

2.2 Zebuembryo Agropecuária S.A.

Localizada na Fazenda Sant'Anna, no município de Delta-MG, a Zebuembryo Agropecuária S.A. é uma central de doadoras especializada na produção de embriões bovinos para venda nacional e internacional. Habilitada para atuar em mais de 32 países, a central também se dedica à hospedagem das fêmeas doadoras (**Figura 5**). Fundada em 2019, ela oferece serviços de aspiração folicular ovariana (Ovum Pick-Up - OPU) de oócitos de doadoras das raças zebuínas e taurinas, incluindo Gir leiteiro, Nelore, Nelore Pintado, Brahman, Guzerá, Sindi, Holandês e Girolando. Além disso, proporciona assistência técnica para diagnóstico de gestação (DG), protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), superovulação (SOV) e transferência de embriões em tempo fixo (TETF).

Figura 5 – Mapa dos países que a Zebuembryo Agropecuária S.A. exporta material genético.



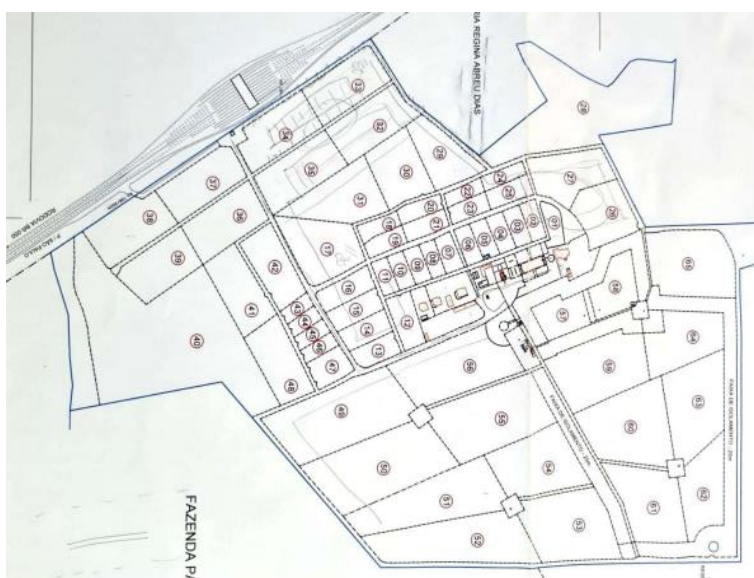
Fonte: Retirada do Instagram da central. Disponível em link: <https://www.instagram.com/p/C7h1AFUxvX4/?igsh=aHozdXRyMGJrajR1>

A equipe da fazenda é composta por médicos veterinários, zootecnistas, colaboradores responsáveis pela limpeza e manutenção do ambiente e manejo dos animais, além de estagiários. A empresa conta ainda com uma equipe comercial, localizada no Parque Fernando Costa, em Uberaba-MG, e uma equipe de campo que

visita as fazendas parceiras pelo Brasil.

A infraestrutura da fazenda foi projetada para oferecer suporte completo à equipe e inclui dois escritórios, alojamentos separados para colaboradores masculinos e femininos, duas cozinhas e residências para o gerente e colaboradores. O espaço é dividido em dois setores principais: um com piquetes para a estalagem de animais destinados à venda nacional, organizados por raça e produtor, e outro para animais destinados à venda internacional, que inclui uma área de quarentena (**Figura 6**).

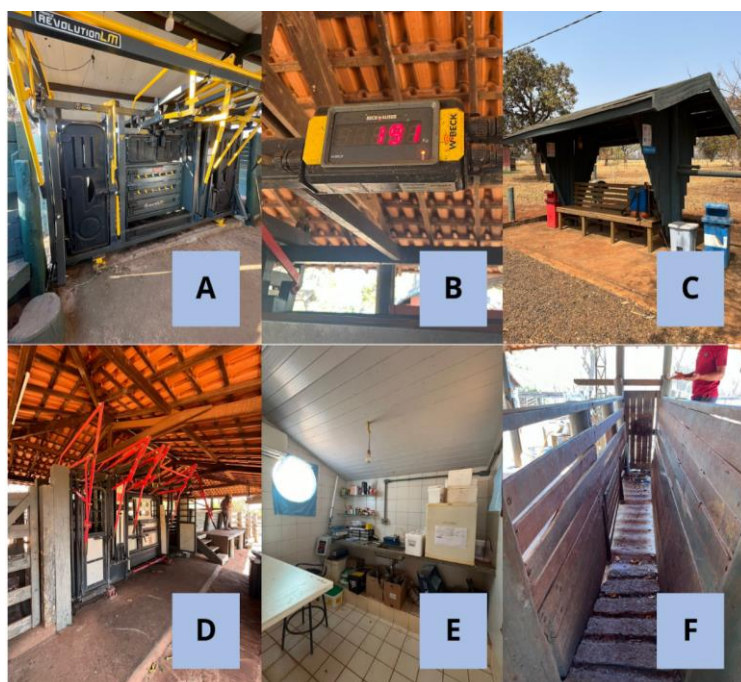
Figura 6 – Representação esquemática da fazenda.



Fonte: Acervo da Zebuembryo Agropecuária S.A. (2024).

Além disso, o ambiente apresenta dois currais, sendo que ambos estão equipados com balanças, bretes e seringas. O curral para o setor nacional também conta com um embarcadouro, uma sala de medicamentos, materiais específicos para manejo reprodutivo e sanitário, e utensílios para contenção (**Figura 7**).

Figura 7 – A. Tronco de contenção da área de exportação. **B.** Balança. **C.** Zona de descontaminação. **D.** Tronco de contenção da área nacional. **E.** Sala de medicamentos. **F.** Seringa.



Fonte: Acervo Pessoal (2024).

Por fim, a estrutura também dispõe de baias para o alojamento de touros e vacas de pista, uma reserva para o descarte de carcaças e a realização de necropsias, uma sala de ordenha e um espaço de armazenamento do leite (**Figura 8**).

Figura 8 – A. Entrada das baias. **B.** Baia individual com animais. **C.** Sala de ordenha. **D.** Tanque de armazenamento do leite.

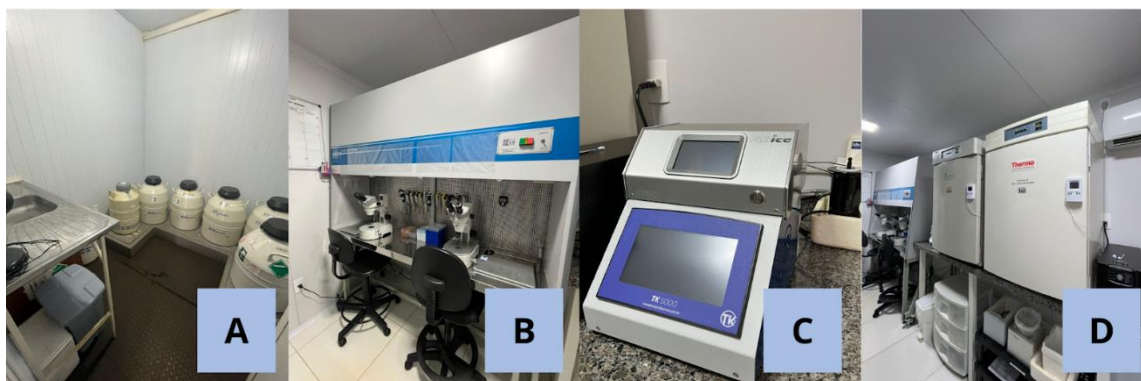


Fonte: Acervo Pessoal (2024).

Por fim, a Zebuembryo possui um centro de colheita e processamento de embriões (CCPE) junto ao laboratório de produção *in vitro* de embriões bovinos e uma

sala para a seleção de oócitos de OPU, além de um sala para estoque de botijões de nitrogênio para o armazenamento da criopreservação de sêmen e embriões (**Figura 9**).

Figura 9 – A. Sala de armazenamento de sêmen e embriões. **B.** Fluxo laminar do laboratório. **C.** Máquina de congelação de embrião. **D.** Estufa de baixa tensão de O₂ do laboratório.



Fonte: Acervo Pessoal (2024).

2.3 Geneal Genética e Biotecnologia Animal.

A Geneal Genética e Biotecnologia Animal - Análise, pesquisa e laboratório S.A, é um laboratório comercial com sede na Rodovia BR 050, Km 184, de Uberaba, MG. A empresa foi fundada em 2009 e é pioneira no Brasil na clonagem de bovinos e, além disso, conta com os serviços de fertilização *in vitro* (FIV) e banco genético de diversas raças zebuínas e taurinas. Além de também proporcionar assistência técnica para os clones até cerca de 5 meses de idade.

A empresa exige que para o início do estágio seja estabelecido um acordo de sigilo referente aos clones e aos protocolos utilizados, dessa forma, não foi autorizado o uso de imagem dos animais e do ambiente. A equipe da fazenda é formada por médicos veterinários, profissionais encarregados da limpeza e manutenção do ambiente, colaboradores responsáveis pela lida e manejo diário do gado e estagiários e o espaço possui escritório, copa e banheiros para o acolhimento da equipe.

A empresa é subdivida em dois setores, sendo eles o laboratório e a fazenda. O nome da fazenda é Santa Elza e é composta por um setor de UTI (Unidade de Tratamento Intensivo) neonatal, sala cirúrgica para cesarianas com tronco tombador, baias individuais para separação dos clones, curral com embarcadouro, balança,

brete, seringa, farmácia e estoques de ração. As receptoras permanecem em piquetes e são separadas em lotes de lactantes, pré parto, prenhas, protocoladas, hospital, vazias e descarte.

Além disso, a fazenda possui um quarentenário para o estabelecimento dos protocolos sanitários para as exportações. Após a quarentena, as doadoras são levadas aos piquetes, são separadas por raças e de acordo com os seus respectivos proprietários e aspiradas no curral de exportação, onde há um laboratório exclusivo para a seleção de oócitos. A empresa conta ainda com um alambique, um espaço para o plantio de silagem de capim e para o armazenamento de silagem de milho.

3. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

3.1 Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da USP.

Durante o período no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD), os estagiários tinham a liberdade para escolher as rotinas laboratoriais que desejavam acompanhar, com o objetivo de adquirir experiências novas e auxiliar a equipe na condução das pesquisas (**Tabela 1**). Também foram desempenhadas funções para a manutenção e reposição dos materiais do laboratório, sendo estes elaborados de acordo com as práticas de higiene do laboratório.

Tabela 1. Quantificação das rotinas acompanhadas no LMMD-FZEA, durante a realização do Estágio Curricular em Prática Veterinária.

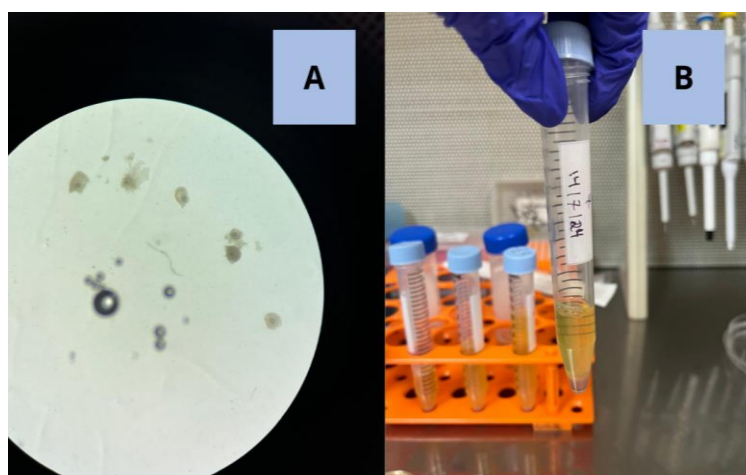
Atividades		Número
Laboratório	Preparação de meios e soluções	4
	Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	5
	Biologia molecular	4
	Criopreservação de espermatozoides	1

	Colheita de fluido ovidutal	2
Campo	Linha de abate de bovinos	2
	Colheita de sangue em bovinos	2
	Protocolo de sincronização de estro e indução da ovulação em bovinos	3
	Palpação retal e ultrassonografia em bovinos	5
Total		28

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Nas primeiras semanas, pude observar a produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE), o que incluiu a aspiração folicular, rastreamento e seleção oocitária, maturação, fertilização e cultivo *in vitro* realizada conforme o protocolo padrão do LMMD (**Figura 10**). Além disso, participei da avaliação da taxa de maturação por meio da extrusão do corpúsculo polar, da avaliação da taxa de clivagem (embriões clivados com dezesseis ou mais células em relação ao total de oócitos, multiplicado por 100) e da taxa de blastocistos (total de blastocistos em relação aos oócitos totais multiplicado por 100), bem como da produção dos meios de lavagem e de cultura utilizados no protocolo.

Figura 10 – A. Imagem de lupa esteromicroscópica para seleção de diversos graus de oócitos. **B.** Fluido folicular após centrifugação por 5 minutos.



Fonte: Acervo pessoal (2024).

A maior parte das rotinas de PIVE estava destinada a experimentos dos pós-graduandos. Nesse contexto, foi possível observar testes de suplementação com alfa-pineno, um antioxidante, em lipossomas inseridos no meio de maturação. Também era realizada a avaliação do estresse oxidativo utilizando sondas fluorescentes, as quais eram analisadas por microscopia de fluorescência e confocalidade no equipamento Microscopy Imaging for Cellular Analysis (MICA). Para tanto, era avaliada a presença de espécies reativas de oxigênio (EROS) através dos corantes H2DCF-DA e Hoescht, além da avaliação do antioxidante glutatona pela sonda Cell Track Blue e dos lipossomas com a coloração de BODIPY.

Além disso, acompanhei ensaios de biologia molecular nos quais foram realizadas rotinas de PCR em tempo real (qPCR) para a análise de microRNAs. Isso incluiu o monitoramento desde a produção do cDNA (DNA complementar) até a preparação da reação de PCR, que envolveu a elaboração de um mix. Nele continha água nuclease free, primer universal, DNA molde, DNA polimerase e sonda fluorescente (Syber Green). A reação era pipetada nos poços de placas com suas respectivas amostras, vedado com adesivo próprio, levada para a centrífuga e, em seguida, para o termociclador para a realização dos ciclos de amplificação. Por fim, também pude acompanhar a interpretação dos resultados, analisando a curva de amplificação, que revela a fluorescência emitida pela sonda, permitindo a quantificação em tempo real e a curva de melting, na qual mostra a temperatura em que ocorreu a dissociação das fitas de cDNA, assim, verificar a especificidade do produto amplificado.

Ademais, tive a oportunidade de acompanhar os protocolos de manipulação do ciclo estral em 10 vacas Nelore para um estudo sobre a interação espermatozoides no microambiente ovidutal sobre o desenvolvimento embrionário bovino. Com isso, no dia zero, foi inserido um dispositivo intravaginal de progesterona (1 g; Sincrogest[®]), administrado 2 ml de benzoato de estradiol (2 mg; Sincrodiol[®]) via intramuscular (IM) e 2ml de cloporstenol (500 mcg; Sincrocio[®]). No dia oito, o dispositivo de progesterona (P4) foi retirado, e foram administrados 2 ml de cloprostenol (Sincrocio[®]), correspondente a 500 mcg por animal e 1 ml de cipationato de estradiol (1 mg; SincroCP[®]) via IM. Além disso, foi inserida a fita Estroprotect para detecção de cio e realizada a ultrassonografia transretal para medir a espessura do endométrio (**Figura 11**).

Figura 11 – A. Fita EstroTECT. **B.** Medição de espessura do endométrio realizada no ultrassom.



Fonte: Acervo pessoal (2024).

No último dia, ou seja, no décimo primeiro dia do protocolo, para a avaliação da resposta estrogênica foi realizada a colheita de sangue para dosagem de estrógeno (E2), realizada a palpação retal para avaliar a tensão uterina e a ultrassonografia transretal foi usada medir o tamanho do folículo dominante (**Figura 12**).

Figura 12 – Medição de folículo dominante no ultrassom.



Fonte: Acervo pessoal da mestrandia Laura Gabrielli Haupenthal (2024).

O abate ocorreu em seguida, com a retirada dos órgãos reprodutivos. As peças foram dissecadas no laboratório, onde recolhiam-se fluidos do útero e do oviduto, através da imersão de 1ml Tampão Fosfato Salino Modificado por Dulbecco (DMPBS) no lúmen, além da colheita do folículo dominante e dos subordinados por aspiração (**Figura 13**). O fluido das fêmeas em estro será utilizado na incubação juntos a espermatozoides para análise das características morfofuncionais e moleculares espermáticas.

Figura 13 – **A.** Imagem vista de cima do aparelho reprodutivo feminino, evidenciando a cérvix, colo e corpo de útero e ovários. **B e C.** Imagem de colheitas de fluido uterino e ovidutal, respectivamente.



Fonte: Acervo pessoal da mestrandia Laura Gabrielli Haupenthal (2024).

Ao final do estágio, tive a oportunidade de participar de um teste de criopreservação de espermatozoides epididimários para um experimento. Inicialmente, as caudas dos epidídimos foram recolhidas de abatedouros, dissecadas e perfundidas com 1 ml de DMPBS para a colheita dos espermatozoides. Em seguida, foi realizada a avaliação da concentração, o vigor e a motilidade dos espermatozoides, e o envase foi realizado em palhetas de 0,5 ml, sob um fluxo laminar. Por fim, a máquina de refrigeração foi utilizada para conduzir as curvas de congelação (**Figura 14**).

Figura 14 – **A.** Imagem vista de cima do aparelho reprodutivo masculino, evidenciando o epidídimo e o testículo. **B.** Imagem da máquina de congelação e o botijão de nitrogênio.



Fonte: Acervo pessoal da doutoranda Ana Beatriz Moura (2024).

3.2 Zebuembryo Agropecuária S.A.

Ao longo do meu estágio na Zebuembryo Agropecuária S.A., tive a oportunidade de acompanhar tanto os técnicos de campo quanto os de laboratório, além de estar envolvida com os setores administrativo e comercial (**Tabela 2**). Neste período, participei de reuniões administrativas, desenvolvi propostas comerciais em colaboração com a equipe de gestão, e executei tarefas relacionadas à organização do rebanho, como a elaboração de planilhas para o registro de parição, saída e entrada dos animais e sêmen, consumo médio geral dos animais, entre outros.

Tabela 2. Quantificação das rotinas acompanhadas na Zebuembryo Agropecuária S.A, durante a realização do Estágio Curricular em Prática Veterinária.

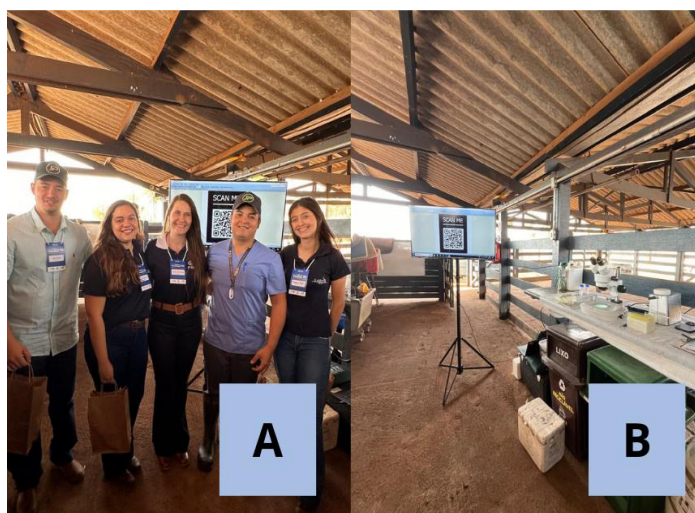
Atividades		Número
Gestão da Fazenda/Comercial	Reuniões comerciais e administrativas	3
	Desenvolvimento de acordos comerciais	15
Laboratório	Seleção de oócitos	4
	Direct Transfer (DT)	2
	Protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF)	4

Campo	Ovum Pick-Up (OPU)	11
	Protocolo de superovulação (SOV)	1
	Colheita de embriões	2
	Transferência de embriões em tempo fixo (TETF)	1
	Diagnóstico de gestação (DG)	12
	Teste de brucelose e tuberculose	10
Total		65

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Também participei de reuniões técnicas voltadas para a formulação de dietas para as doadoras, em parceria com o grupo SCL Agro (Sacramento-MG), sendo fornecido silagem de capim, silagem de milho, ração e Fosbovi® proteico 35M aos animais. Além disso, participei de seminários, na qualidade de oradora, com os temas "Seleção de Receptoras para Transferências de Embriões Bovinos" e "Aspiração Folicular em Bovinos: Técnicas e Melhorias na Eficiência Reprodutiva", sendo o último realizado no curral das Faculdades Associadas de Uberaba (FAZU-MG) (**Figura 15**).

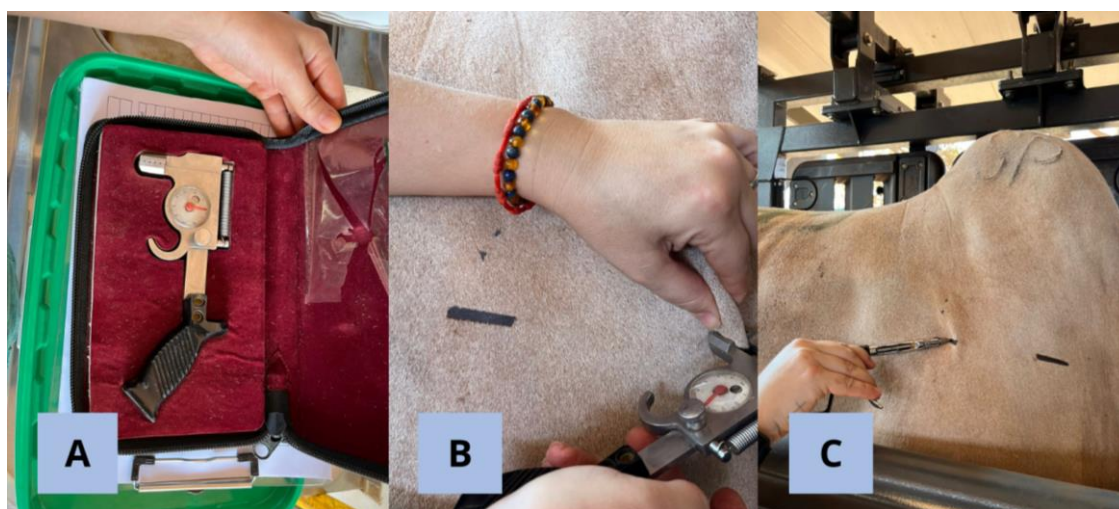
Figura 15 – A. Equipe de palestrantes do seminário na FAZU. **B.** Ambiente destinado a aula prática na FAZU.



Fonte: Acervo pessoal (2024).

Diante da constante movimentação de entrada e saída dos animais, pude acompanhar o diagnóstico de tuberculose para o atestado de sanidade dos animais. Este era efetuado por meio de um teste cervical comparativo, que envolvia a aplicação de 0,1 ml da tuberculina bovina e aviária, via intradérmica, no terço médio do pescoço do animal e, após 72 horas, a medição da reação ao local de injeção com o cutímetro Walmur (**Figura 16**).

Figura 16 – A. Cutímetro Walmur. B. Medição da espessura de pele anterior à aplicação da tuberculina. C. Aplicação da tuberculina bovina via intradérmica.



Fonte: Acervo pessoal (2024).

Já para o diagnóstico de brucelose era realizada a colheita de sangue da cauda dos animais, e após centrifugação, o soro era retirado e enviado ao Instituto Biológico de São Paulo para a realização do teste (**Figura 17**).

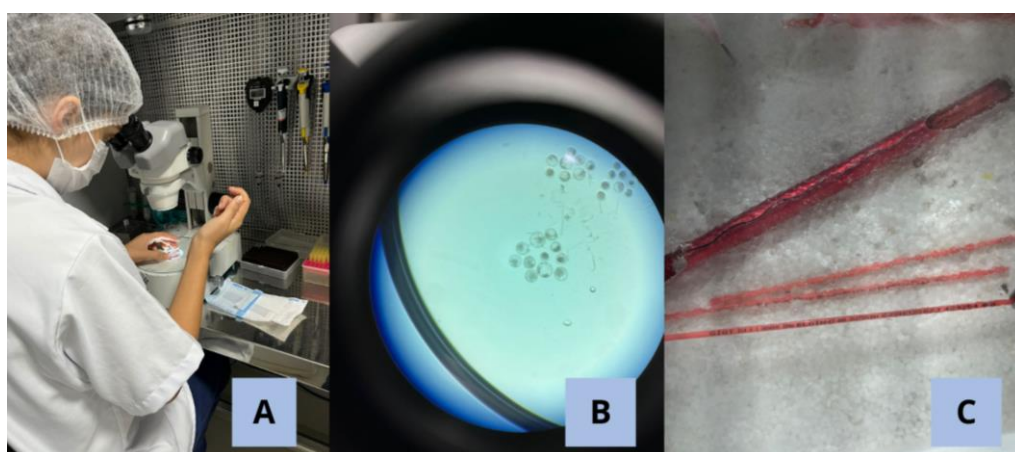
Figura 17 – A. Tubos de colheita a vácuo para o exame de brucelose. B. Colheita de sangue realizada na veia coccígea.



Fonte: Acervo pessoal (2024).

No laboratório, tive a oportunidade de auxiliar os técnicos no congelamento lento de embriões ou Direct Transfer (DT) e praticar o envase das palhetas com embriões já descartados. Além disso, frequentemente separava o sêmen destinado à fertilização *in vitro* pós OPU (**Figura 18**).

Figura 18 – **A.** Envase de palhetas de embriões para DT. **B.** Imagem microscópica de blastocistos expandidos no D7. **C.** Palheta de sêmen imersa em nitrogênio.

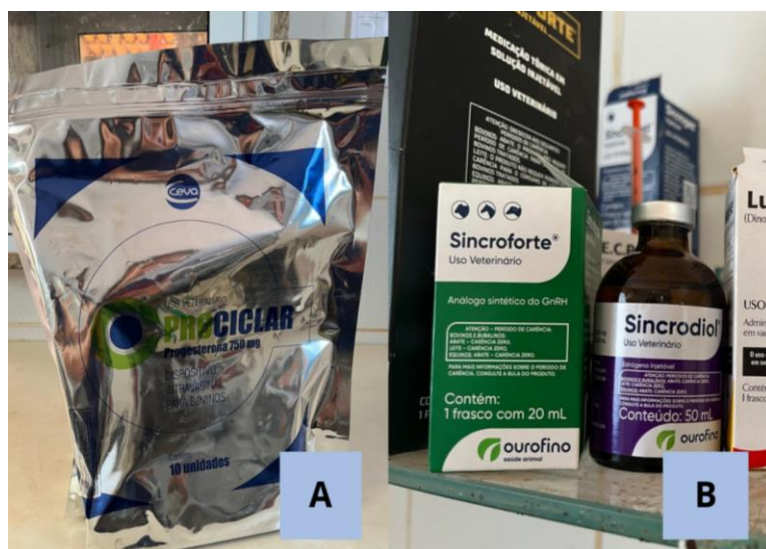


Fonte: Acervo pessoal (2024).

No campo, acompanhei protocolos de IATF de novilhas Gir, no qual, no dia 0 (D0), eram administrados 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol®) e um

dispositivo intravaginal de progesterona de 750 mg (Prociclar®). No dia 8 (D8), o dispositivo intravaginal era removido e eram administrados 0,5 mg de cipionato de estradiol (SincroCP®), 2 ml de cloprostenol (Sincrocio®) e 200 UI de gonadotrofina coriônica equina-eCG (Novormon®) por animal. No Dia 10 (D10), era realizada a inseminação artificial (**Figura 19**). Além disso, também auxiliei no D0 de vacas Holandesas em fazendas parceiras, sendo administrado 2mg de benzoato de estradiol (FertilCare® Sincronização) e diante de ter apenas dispositivos de P4 de 2º uso (Crestar® 1g) foram inseridos dois dispositivos por animal (Crestar®).

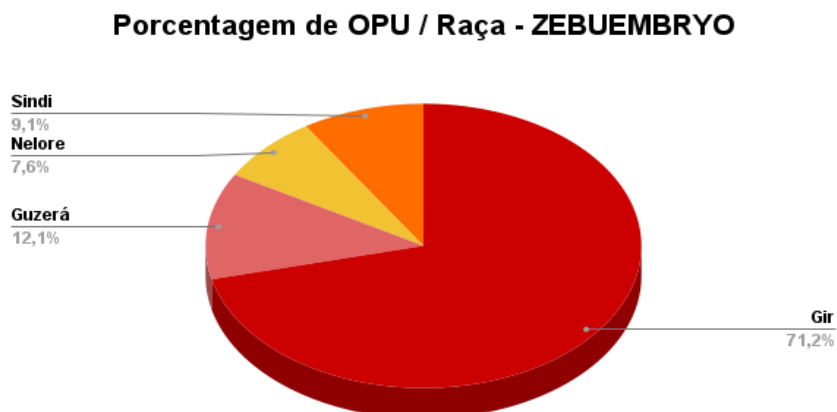
Figura 19 – A. Dispositivo de progesterona utilizado na IATF (Prociclar®). **B.** Medicamentos injetáveis utilizados na IATF (Sincrocio® e Sincrodiol®).



Fonte: Acervo pessoal (2024).

Adicionalmente, participei de diversos protocolos de OPU, no qual foram aspiradas 132 vacas da raça Nelore, Sindi, Gir e Guzerá (**Figura 20**), que incluíam as etapas de contenção do animal, anestesia epidural baixa com cloridrato de lidocaína a 2% com vasoconstritor (LIDOfarm®), sendo a dosagem variada com a categoria e escore de condição corporal do animal (ECC), aspiração folicular e seleção de oócitos para a PIVE (**Figura 21**).

Figura 20 – Representação gráfica da quantidade de animais aspirados por raça durante o período de Estágio Curricular em Prática Veterinária na Zebuembryo Agropecuária S.A.



Fonte: Elaboração do autor.

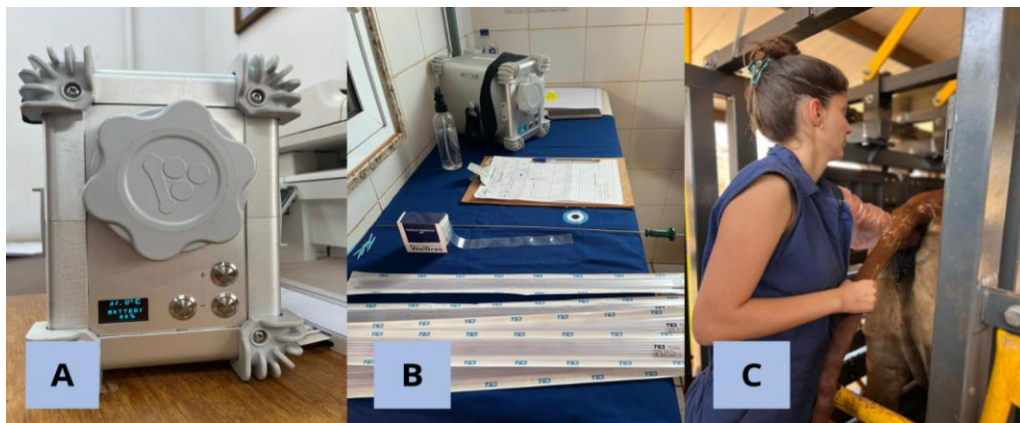
Figura 21 – **A.** Imagem da tela do ultrassom no momento da OPU. **B.** Imagem vista de cima dos aparelhos necessários para OPU, enfatizando o ultrassom, a bomba de vácuo, a guia de aspiração, as luvas de palpação, entre outros.



Fonte: Acervo pessoal (2024).

Também estive envolvida em diagnósticos de gestação por meio da palpação retal e da utilização de ultrassonografia retal com Doppler de vacas Nelore e Holandesas nas fazendas parceiras. Além disso, acompanhei transferências de embriões (TE) frescos de doadoras da raça Gir para receptoras da raça Girolando. Para isso, era avaliada a qualidade do corpo lúteo (CL) e sua localização, de modo a assegurar que a deposição do embrião ocorresse no corno uterino ipsilateral ao CL (**Figura 22**).

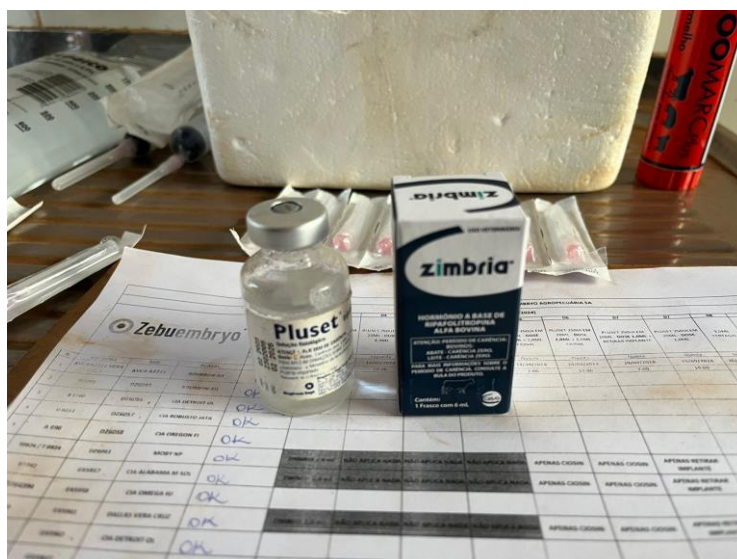
Figura 22 – **A.** Transportador de embriões a 37°C. **B.** Imagem dos equipamentos necessários para a TE, ressaltando a bainha, camisinha sanitária, transportador de embriões e inovulador. **C.** Estagiária realizando exame de palpação retal em fêmeas da raça Gir.



Fonte: Acervo pessoal (2024).

Por fim, colaborei nas etapas de um protocolo de SOV *in vivo* em vacas Nelore para a exportação de embriões congelados para o Canadá, no qual se era utilizado tanto um FSH recombinante (Zimbria®) quanto um FSH de origem suína (Pluset®), que é amplamente utilizado no mercado (**Figura 23**).

Figura 23 – Imagem dos medicamentos utilizados no protocolo junto com a ficha de controle dos animais.



Fonte: Acervo pessoal (2024).

3.3 Geneal Genética e Biotecnologia Animal.

Durante o período de estágio na Geneal Genética Animal, tive a oportunidade de acompanhar os manejos reprodutivos das doadoras e receptoras, além de também desempenhar funções para a manutenção e limpeza das baias e no aleitamento dos bezerros, que ocorria duas vezes ao dia (**Tabela 3**).

Tabela 3. Quantificação das rotinas de manejo reprodutivo durante a realização do Estágio Curricular em Prática Veterinária na Geneal Genética e Biotecnologia Animal.

Atividades		Número
Reprodutivo	<i>Produção in vivo</i> de embriões	1
	Cesárea	6
	Onfaloplastia	5
	Orquiectomia	7
	Diagnóstico de gestação (DG)	3
Total		22

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Para tanto, tive a oportunidade de acompanhar as rotinas de diagnóstico de gestação (DG) no trigésimo e no sexagésimo dia de embriões produzidos por fertilização *in vitro*, sendo que as receptoras eram mestiças e a transferência ocorria em fazendas parceiras. Ademais, pude auxiliar nos respectivos DGs, nos quais discutia-se se a vaca continuaria em novos protocolos caso estivesse vazia ou se seria descartada.

Adicionalmente, colaborei nas etapas de um protocolo de superovulação (SOV) em três vacas da raça Gir, destinado à exportação de embriões congelados, no qual utilizava-se o Folltropin-V® em doses decrescentes. Assim, também auxiliei na inseminação artificial como uso de sêmen sexado e na colheita dos embriões.

Ademais, considerando os desafios da gestação em animais clonados, as receptoras eram induzidas 36 horas antes das cesarianas eletivas, recebendo 20 mg

de dexametasona via intramuscular e 500 mcg de cloprostenol via intramuscular, visando a dilatação cervical e a expulsão do feto. Essa etapa ocorria, em média, aos 292 dias de gestação. Caso o parto normal não se concretizasse, o procedimento subsequente seria a cesárea. Assim, os animais eram contidos no tronco tombador, e os cirurgiões realizavam a antissepsia e a devida paramentação. Em seguida, era efetuada a tricotomia, a limpeza local com clorexidina degermante a 2% e a anestesia infiltrativa com cloridrato de lidocaína a 2% com vasoconstritor (60-80 ml via subcutânea) na região acima da veia mamária; se necessário, a anestesia era reaplicada nos pontos com sensibilidade. Após isso, realizava-se a cesariana, a avaliação da vitalidade e onfaloplastia do neonato, proporcionando aos estagiários a oportunidade de auxiliar na oxigenação e medicação, além de realizar a sutura das camadas de tecido muscular e pele da receptora.

Com a vaca e o bezerro estáveis, iniciava-se o aleitamento com 1,5 a 2 L de colostro em pó ou congelado. 24 ou 48 horas após o aleitamento, avaliava-se a transferência de imunidade passiva (TIP) através de um refratômetro. Para isso, após a colheita, o sangue era centrifugado e o soro avaliado (**Tabela 4**). Caso o animal não apresentasse o reflexo de sucção, o colostro era ofertado através de uma sonda orogástrica. O procedimento consistia na introdução de uma sonda oral até o abomaso, com ausculta realizada para confirmar a localização correta.

Tabela 4 - Classificação da transferência de imunidade passiva (TIP) através do refratômetro.

Qualidade do colostro	Brix (%)
Excelente	> 9,4
Bom	8,9 - 9,3
Razoável	8,1-8,8
Ruim	< 8,1

Fonte: Elaboração do autor.

Os bezerros eram separados das receptoras e encaminhados as baias dos setor de UTI. Já as receptoras após a cesárea eram alocadas no piquete “hospital”, no qual era realizada a administração de antiinflamatórios e antibióticos, além da

limpeza do curativo por cinco dias para evitar a formação de miíases. A terapia era realizada para evitar que o animal viesse a óbito, uma vez que, após a retirada dos pontos as vacas eram vendidas para o abatedouro.

Também estive envolvida na realização de orquiectomias de bezerros mestiços com aproximadamente 4 meses de idade, no qual foram contidos no tronco, realizado anestesia local com cloridrato de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Bloc®) nos testículos, efetuado a castração aberta com fechamento por segunda intenção e imersão de iodo a 10%.

Ademais, colaborei com a equipe no manejo clínico e terapêutico dos clones, sendo realizado um protocolo de acompanhamento por 120 dias, no qual era fornecido suporte, limpeza e curativo do umbigo cirúrgico com pomada de penicilina G e diidroestreptomicina (Ganadol®), além da vacinação com 2ml da vacina contra a raiva (Raivacel Multi®), via intramuscular e 1ml da vacina contra doenças respiratórias causadas por vírus sincicial (BRSV); rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR); parainfluenza tipo 3, via intranasal (Inforce 3®), por fim, também era realizada a administração de 1ml/50kg de Ivermectina (Ivomec®), via subcutânea (SC).

Com isso, era realizada diariamente a avaliação dos parâmetros vitais dos bezerros e, caso necessário, era iniciado alguma terapêutica. Os parâmetros avaliados com frequência eram a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), turgor cutâneo, tempo de preenchimento capilar (TPC), coloração de mucosa oral e oculopalpebral, temperatura corporal (T°C), glicemia e avaliação do estado geral (**Tabela 5**).

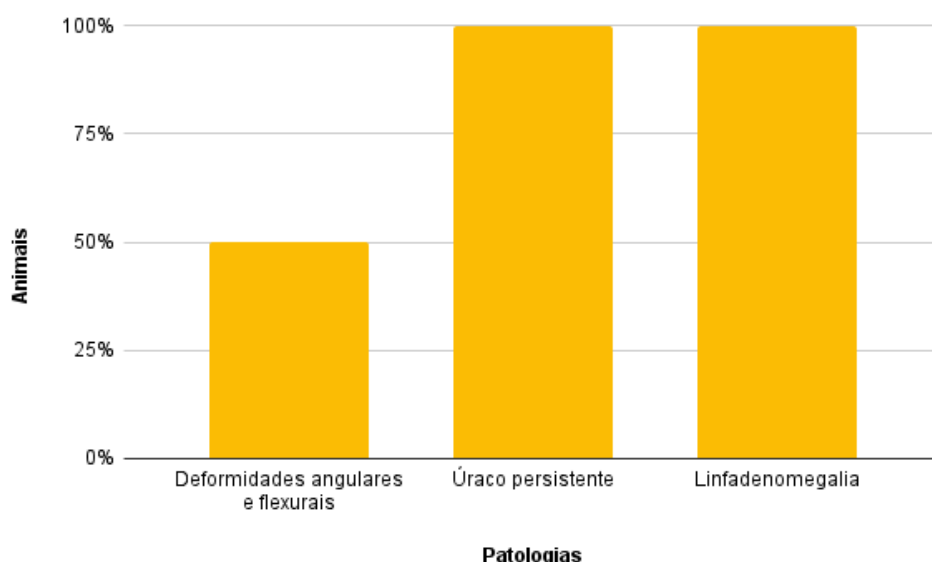
Tabela 5 - Intervalos dos parâmetros vitais classificados como excelente ou bom em bezerros e neonatos.

Parâmetros Vitais	FC (bpm)	FR (mrpm)	TPC (seg)	Coloração da mucosa	T°C
Bezerros	70-100	24-36	1 a 2	Rósea	38,5 a 39,5
Neonatos	90-150	50-75	1 a 2	Rósea-avermelhada	39,2 a 39,7

Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

Por fim, ao longo do estágio foi notado que os animais nasciam frequentemente com algumas adversidades anatômicas, como linfadenomegalia do linfonodo inguinal e deformidades flexurais e angulares e úraco persistente, sendo que os quatro clones nascidos apresentaram, no mínimo, uma das 3 patologias acima **(Figura 24)**. Entre as seis cesárias acompanhadas, em apenas uma o bezerro era natimorto.

Figura 24 – Representação gráfica da porcentagem de animais com patologias congênicas (n = 4) durante o período de Estágio Curricular em Prática Veterinária na Geneal Genética e Biotecnologia Animal.



Fonte: Elaborado pelo autor (2024).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, tive a oportunidade de vivenciar diversas técnicas de reprodução, manejo e produção animal e as abordagens de cada profissional, com isso, pude desenvolver uma visão ampla da atuação técnica do médico veterinário no mercado. Além disso, também pude aperfeiçoar e solidificar os conhecimentos teórico-práticos e ampliar a rede de contatos com profissionais já estabelecidos no mercado da reprodução bovina.

II. MONOGRAFIA

APLICAÇÃO DE FSH RECOMBINANTE (ZIMBRIA®) EM DOADORAS DA RAÇA NELORE

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a produção animal no Brasil tem se modernizado, resultando em aumentos significativos da produtividade do rebanho e na qualidade da produção (BINYAMEEN et al., 2019; GALLI et al, 2003). O aprimoramento do setor foi alcançado diante dos avanços científicos e tecnológicos nas estratégias de manejo e de alimentação, além disso, outro fator de impacto para o desenvolvimento da pecuária é o constante avanço no potencial genético dos animais (DE ALENCAR, 2004). O melhoramento genético animal fundamenta-se na exploração da variabilidade biológica tanto dentro de uma raça quanto entre raças de uma mesma espécie (CHOUDHARY et al., 2016; GALLI et al, 2003)

Nesse contexto, as biotecnologias de reprodução emergem como ferramentas valiosas para aumentar a eficiência reprodutiva e, por conseguinte, aumentar a lucratividade do rebanho. A título de exemplo, em vacas leiteiras, o desempenho reprodutivo é o responsável direto pela produção de leite por dia de vida útil da vaca (GALLI et al, 2003).

Desse modo, a técnica de produção *in vivo* de embriões tem como diretriz ampliar a capacidade reprodutiva das fêmeas, com isso, a técnica de superovulação propõe produzir um número significativamente maior de descendentes com qualidade genética superior e em intervalos menores do que processos fisiológicos naturais ou até mesmo com o uso da inseminação artificial (CHOUDHARY et al., 2016; LONERGAN et al, 2007). Para tanto, o presente trabalho tem como objetivo relatar um protocolo de produção *in vivo* de embriões, por meio da aplicação de FSH recombinante (Zimbria®) em doadoras da raça Nelore com histórico de baixa produção de embriões.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dinâmica folicular

O ciclo estral em bovinos apresenta uma duração média de 21 dias e é regulado pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, responsável pela liberação dos hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Esses hormônios estimulam o desenvolvimento dos folículos ovarianos e a formação do corpo lúteo (GIMENES et al., 2024). Durante cada ciclo estral, ocorre um processo dinâmico de desenvolvimento folicular, conhecido como onda folicular, que pode variar de uma a quatro ondas, dependendo de fatores como raça, categoria e nutrição. Por exemplo, vacas de alta produção leiteira frequentemente apresentam um padrão de duas ondas foliculares, resultado de um maior fluxo sanguíneo e metabolização hepática, o que intensifica o catabolismo dos hormônios esteroides (BARUSELLI; GIMENES; SALES, 2007).

Na onda de crescimento folicular, três fases estão presentes: recrutamento folicular, divergência folicular e dominância folicular, a qual pode ou não culminar em ovulação. A fase de recrutamento refere-se ao início do crescimento de múltiplos folículos, induzido pelo FSH. A fase de divergência corresponde à seleção de um único folículo para se tornar dominante, inibindo, assim, o desenvolvimento dos demais, denominados folículos subordinados (GIMENES et al., 2024).

A fase de dominância é caracterizada pelo desenvolvimento do folículo dominante (FD), que alcança diâmetros pré-ovulatórios de 11,3 a 12,1 mm em *Bos indicus* (GIMENES et al., 2024; BARUSELLI; GIMENES; SALES, 2007). Em seguida, caso o animal se encontre em fase luteínica e, conseqüentemente, limitado pela baixa frequência de pulsos de LH, o folículo entrará em atresia simultaneamente ao início de nova onda folicular (GIMENES et al., 2024).

Dessa forma, a ovulação ocorre apenas sob condições de luteólise, associada a uma maior frequência de pulsos de LH, entre 26 a 32 horas após o pico de LH, resultando na liberação de apenas um oócito, caracterizando a espécie como monovulatória. Esse fenômeno envolve uma sequência de eventos que culmina na ruptura da parede do folículo dominante (FD), permitindo a

liberação do complexo *cumulus-oócito* (CCO) para fecundação no interior da tuba uterina, especificamente no terço médio, na ampola (GIMENES *et al.*, 2024).

Após a ovulação, inicia-se o processo de luteinização, no qual o tecido remanescente do folículo passa por uma remodelação das células da teca e da granulosa, dando origem a um novo corpo lúteo (CL). Essa fase resulta na síntese de progesterona (P4), o principal hormônio responsável pela manutenção da prenhez (GIMENES *et al.*, 2024).

2.2 Superovulação

A superovulação (SOV) visa promover o crescimento simultâneo de vários folículos e suas ovulações para obter o número máximo de embriões de vacas com alto valor genético (BÓ; MAPLETOFT, 2014; BARUSELLI *et al.*, 2006). Para o sucesso da técnica é necessário que os efeitos inibitórios do folículo dominante sobre o crescimento dos folículos subordinados sejam bloqueados e estes, ao invés de entrarem em atresia, se tornem folículos ovulatórios. Para tanto, doses exógenas de FSH ou gonadotrofina coriônica equina (eCG) são administradas antes que se estabeleça a dominância e assim, permite que os múltiplos folículos presentes no início de uma onda de crescimento tenham condições de alcançar diâmetros pré ovulatórios e adquiram capacidade de ovular sob estímulo do LH (VIANA; CAMARGO, 2024; BÓ; MAPLETOFT, 2014).

Os protocolos de SOV mais amplamente estabelecidos no mercado são fundamentados na administração do FSH em oito doses decrescentes por quatro dias seguidos. É necessário que as doses sejam decrescentes, uma vez que à medida que os folículos crescem e atingem o diâmetro associado à divergência eles se tornam progressivamente menos dependentes do FSH e mais dependentes do LH, sendo que este hormônio permite o crescimento final e a maturação dos folículos ao final do tratamento (VIANA; CAMARGO, 2024; PENITENTE FILHO, 2011).

A técnica pode ocorrer sem necessidade de detecção do estro, sendo assim, é necessária a sincronização da onda folicular junto a SOV. Com isso, a técnica também utiliza do emprego de benzoato de estradiol mais o dispositivo intravaginal de P4 no primeiro dia, esses medicamentos quando associados

causam atresia folicular e o crescimento de uma nova onda folicular. Após oito dias do início do protocolo, a administração de PGF2 α junto a retirada do dispositivo intravaginal é realizada com o propósito de reduzir os níveis de P4, suprimir o pico do LH, além disso, é incorporado um GnRH para induzir a ovulação para que 12 ou 24h depois seja realizada a inseminação artificial (VIANA; CAMARGO, 2024; PENITENTE FILHO, 2011).

2.3 Colheita e seleção de embriões

A colheita de embriões envolve a lavagem de ambos os cornos uterinos com Tampão Fosfato Salino Modificado por Dulbecco (DMPBS), de modo que os embriões no lúmen sejam recuperados até um filtro de colheita, no qual ficam retidos (VIANA; CAMARGO, 2024). O procedimento ocorre entre os dias 6 e 7 após a inseminação, uma vez que os embriões chegam ao útero em torno do quinto dia após a ovulação (VIANA, 2009).

Ao término da técnica, a doadora deve receber um luteolítico para garantir a involução dos corpos lúteos formados e o retorno do ciclo estral (VIANA; CAMARGO, 2024). Após a colheita, é necessário identificar, classificar os embriões e direcionar eles para a transferência a fresco ou congelado (VIANA; CAMARGO, 2024).

A classificação do estágio de desenvolvimento de embriões bovinos ocorre de acordo com os critérios da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), a qual usa códigos numéricos que vão de 1 (oócito não fecundado) até 9 (blastocisto eclodido e expandido). Por outro lado, a taxa de prenhez após a transferência de embriões (TE) também é determinada pela qualidade embrionária, no qual a IETS usa códigos que vão de 1 (embriões de qualidade excelente ou boa) até 4 (embriões mortos ou degenerados) (BÓ; MAPLETOFT, 2013; VIANA, 2009).

A literatura indica que há diferença estatística entre as taxas de prenhez de acordo com o grau de qualidade do embrião, no qual é determinado pela visualização das características morfológicas, como uniformidade de blastômeros (tamanho, cor e forma), presença de células extrusadas e presença de blastômeros mortos/degenerados (ERDEM et al., 2020). Segundo Erdem et al. (2020), embriões

Código I tiveram uma taxa de prenhez maior do que os embriões Código II (44,15 vs. 32,58%, respectivamente).

Entretanto, em relação ao estágio de desenvolvimento há diversos estudos que indicam que não há diferença significativa nas taxas de prenhez (HASLER, 2001; BÉNYEI et al., 2006; FERRAZ et al., 2016).

2.4 Seleção das doadoras

A variação individual na resposta superovulatória representa um obstáculo para o avanço da técnica, uma vez que 20 a 30% das doadoras não são responsivas aos tratamentos superovulatórios, no qual é observado uma significativa discrepância nos números de corpos lúteos e, conseqüentemente, de embriões viáveis (OLIVEIRA; SERAPIÃO; QUINTÃO, 2014; BARUSELLI et al., 2006). Tal variação é dependente de diversos fatores, como genética, nutrição, escore de condição corporal (ECC) e higidez reprodutiva (PHILIPS & JAHNKE, 2016; OLIVEIRA; SERAPIÃO; QUINTÃO, 2014). Para tanto, é necessário selecionar fêmeas com alto valor genético, com ciclos estrais regulares, bem nutridas e mineralizadas, com vacinações em dia e livres de doenças infectocontagiosas, especialmente aquelas que podem afetar negativamente o desempenho reprodutivo, como a brucelose, leptospirose, tricomonose, campilobacteriose e diarreia viral bovina (PHILIPS & JAHNKE, 2016). Além disso, é imprescindível que no exame reprodutivo sejam descartadas aquelas que apresentem patologias de etiologia genética, bem como defeitos anatômicos que possam dificultar ou inviabilizar o procedimento, como cérvix tortuosa, aderências e neoplasias (OLIVEIRA; SERAPIÃO; QUINTÃO, 2014).

2.5 Seleção de receptoras

As taxas de concepção observadas após a transferência de embriões de animais doadores para receptoras são influenciadas por diversos fatores, como a qualidade do embrião, uso de semên sexado ou convencional e a experiência do

operador (PHILIPS & JAHNKE, 2016).

Além disso, características relacionadas às receptoras, como a qualidade do corpo lúteo, raça, categoria, escore de condição corporal (ECC) e higidez reprodutiva são pontos cruciais para a obtenção de bons resultados na produção *in vivo* de embriões (PHILIPS & JAHNKE, 2016). A título de exemplo, Ferraz et al. (2016) relataram que a taxa de prenhez por transferência de embriões foi superior em nulíparas (42%) em comparação às primíparas (37,8%) e vacas múltiparas (31,6%). Apesar das taxas de prenhez mais elevadas, a utilização de novilhas em um rebanho apresenta desvantagens, como as altas taxas de partos distócicos (FERRAZ et al., 2016; PHILIPS & JAHNKE, 2016). Além disso, a inclusão de novilhas na produção de leite tende a resultar em volumes inferiores se comparado ao desempenho de vacas múltiparas (FERRAZ et al., 2016).

Outro aspecto relevante no momento da transferência de embriões é a avaliação da qualidade do corpo lúteo (CL), que é classificada com base na perfusão sanguínea por meio da ultrassonografia em modo B e doppler colorido (THOMSON et al, 2021; PUGLIESI et al, 2019). Em um estudo com receptoras mestiças a taxa de prenhez apresentou uma associação positiva com perfusão lútea elevada (58,4%), enquanto as receptoras com baixa perfusão lútea obtiveram menor taxa de prenhez (45,9%) (PUGLIESI et al, 2019).

Ademais, a literatura revela que nutrição está envolvida diretamente no ciclo de alta fertilidade. A título de exemplo, Moraes e colaboradores (2006) revela que a frequência de vacas prenhes com boa condição corporal aos 60 a 81 dias pós-parto apresentam maior taxa de prenhez (69%) do que vacas razoáveis (56%) e magras (30%).

3. RELATO DE CASO

No dia 12 de setembro de 2024, foi iniciado um protocolo de produção *in vivo* de embriões com a aplicação de FSH recombinante (Zimbria®, Ceva), visando a exportação dos mesmos para o Canadá. Este protocolo foi realizado na Zebuembryo Agropecuária S.A., em parceria com a STRepro e a GeraEmbryo, com o intuito de otimizar o manejo reprodutivo e melhorar as taxas de embriões

congelados de vacas com histórico de baixa produção.

Durante o período do protocolo de superovulação (SOV), foram selecionadas quatro doadoras da raça Nelore, todas com idade superior a cinco anos e vazias. Os animais selecionados pertenciam à empresa STRepro. Em agosto de 2024, foi iniciado um protocolo de produção de embriões *in vivo* para exportação, utilizando o Pluset®. As vacas produziram, em média, 0,75 embriões congelados por Direct Transfer (DT), no qual foram classificados como Mórula (MO) e Blastocisto inicial (BI) (**Tabela 6**).

Tabela 6. Quantidade de embriões congelados e corpos lúteos (CLs) formados no mês de agosto de 2024.

Animais	Embriões DT	Quantidade de CL
EA5957	0	8
EA5961	2	5
EA5967	1	6
DZ6061	0	1
Média	0,75	5,00

Fonte: Elaborado pelo autor.

Diante do histórico improdutivo de embriões em resposta ao Pluset®, os proprietários optaram por experimentar um novo medicamento injetável, o Zimbria®.

No primeiro dia do protocolo (D0), foi inserido um dispositivo intravaginal de P4 (Fertilcare® 600), correspondente a 0,6g por animal e administrados 2 mg de benzoato de estradiol (Fertilcare® Sincronização), via intramuscular (IM), tal combinação causa atresia folicular com subsequente sincronização de uma nova onda (**Figura 25**). No início do quarto dia (D4), foram administrados 100 mcg de ripafolitropina alfa bovina (Zimbria®), via IM, somente dois dias depois foram aplicados duas doses de 2 ml de Cloprostenol (500 mcg; Ciosin) via IM, em intervalos de 12 horas, como um potente agente luteolítico.

Figura 25 – **A.** Dispositivo intravaginal Ferticare® 600. **B.** Estagiária Mayara Paglione realizando a administração de Ciosin® nas vacas do protocolo de SOV.



Fonte: Acervo pessoal (2024).

No início do sétimo dia, o dispositivo foi removido, e no oitavo dia (D8), foi administrada 3,5ml de GnRH (Fertagyl®), correspondente a 350mcg por animal, via IM, com o objetivo de induzir o aumento do hormônio luteinizante, assim, prevenindo uma ovulação retardada. Devido a múltiplas ovulações, a inseminação artificial foi realizada com três doses de sêmen convencional, sendo as duas primeiras inseminações realizadas 12 horas após a injeção de Fertagyl® e a terceira 24 horas após a administração do medicamento (**Figura 26**).

Figura 26 – **A.** Imagem vista de cima dos aparelhos necessários para IA, acentuando o descongelador de sêmen, os inoculadores e as bainhas, entre outros. **B.** Muco cervical ressaltando os sinais de estro.



Fonte: Acervo pessoal (2024).

Nos dias quatorze e quinze, foi realizada a colheita de embriões pela equipe Geraembryo. Inicialmente, foi realizada uma avaliação ultrassonográfica para verificar a presença de CL e em seguida, era administrado 3ml de Cloprostenol (Ciosin®), via IM (750mcg/animal) **(Figura 27)**. Caso o animal não apresentasse resposta ao protocolo, ou seja, não houvesse a identificação de nenhum CL, não era realizada a colheita dos embriões. O manejo procedeu-se com a higienização da região perineal, seguida da anestesia da doadora, que foi realizada por meio de uma injeção epidural baixa com 4 ml de cloridrato de lidocaína a 2% (9mg/kg) com vasoconstritor (LIDOfarm®).

Figura 27 – A. Ovário esquerdo de vaca superovulada com a presença de corpo lúteo (CL) com aspecto ecogênico. **B.** Ovário direito de vaca superovulada, com a presença de corpo lúteo com aspecto ecogênico.

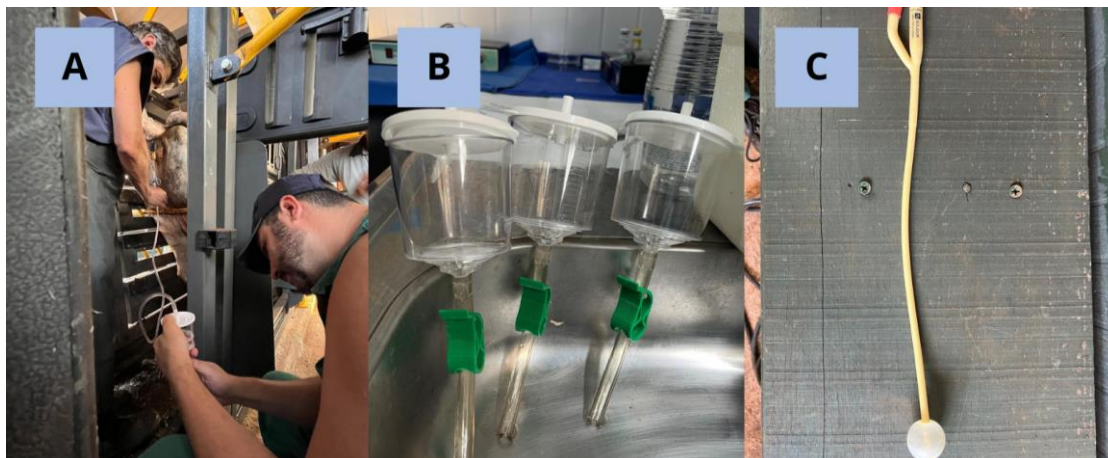


Fonte: Acervo pessoal da equipe GeraEmbryo e Zebuembryo Agropecuária S.A. (2024).

Foi estabelecido um sistema fechado para a colheita de embriões, utilizando uma sonda de Foley estéril tamanho 18. Esta sonda foi acoplada a uma sonda em Y e, nas extremidades do sistema, foram fixados um frasco de DMPBS e um copo coletor de embriões. Após a inserção da sonda por via intracervical, a sonda foi posicionada em ambos os cornos uterinos, onde o balão foi inflado com ar **(Figura 28)**.

Figura 28 – A. Procedimento de transferência de embriões realizado pela equipe

da GeraEmbryo **B.** Copo coletor junto ao filtro. **C.** Sonda de Foley inflada.

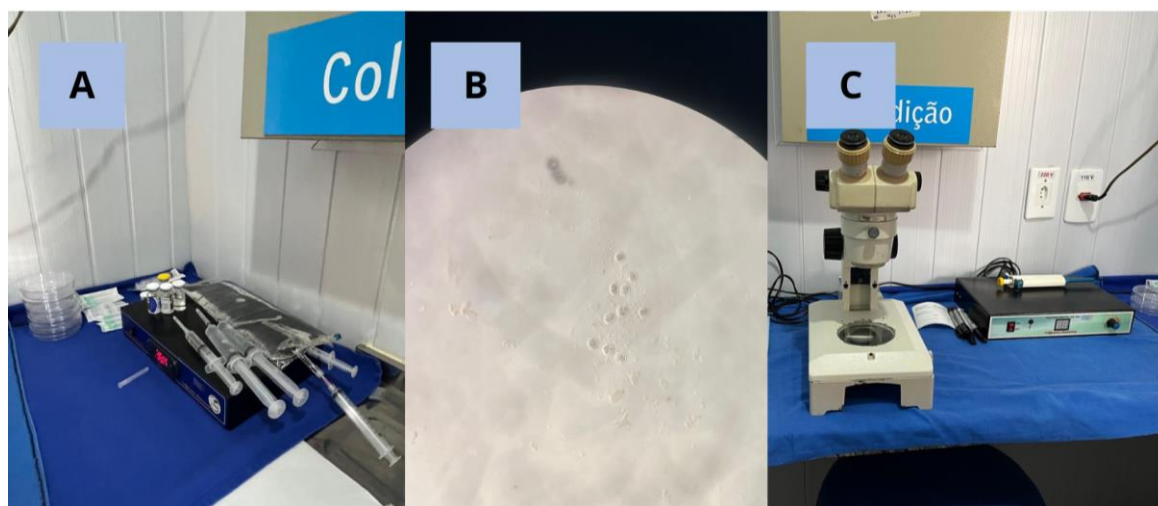


Fonte: Acervo pessoal (2024).

A lavagem uterina foi realizada via intracervical, utilizando de 500 ml a 1 L de DMPBS em cada corno, com a quantidade aplicada determinada pelo tamanho do útero. Por fim, foram administrados 3 ml de Ciosin® (0,75mg/animal) para promover a luteólise dos corpos lúteos acessórios (CLa).

Após a colheita, os embriões foram transportados ao laboratório, onde o copo coletor foi lavado com DMPBS para remover os embriões aderidos ao filtro, sendo, então, transferidos para uma placa de Petri. Os embriões foram rastreados e selecionados de acordo com a classificação da IETS (International Embryo Technology Society). Na sequência, foram submetidos a uma lavagem com nove gotas de 200 µl de Holding Plus®, meio de manutenção, e uma gota de tripsina, uma enzima que auxilia na eliminação de patógenos, permanecendo em contato por no máximo 90 segundos. Em seguida, os embriões foram armazenados na placa de petri em uma mesa aquecedora (37°C) até a classificação dos demais (Figura 29).

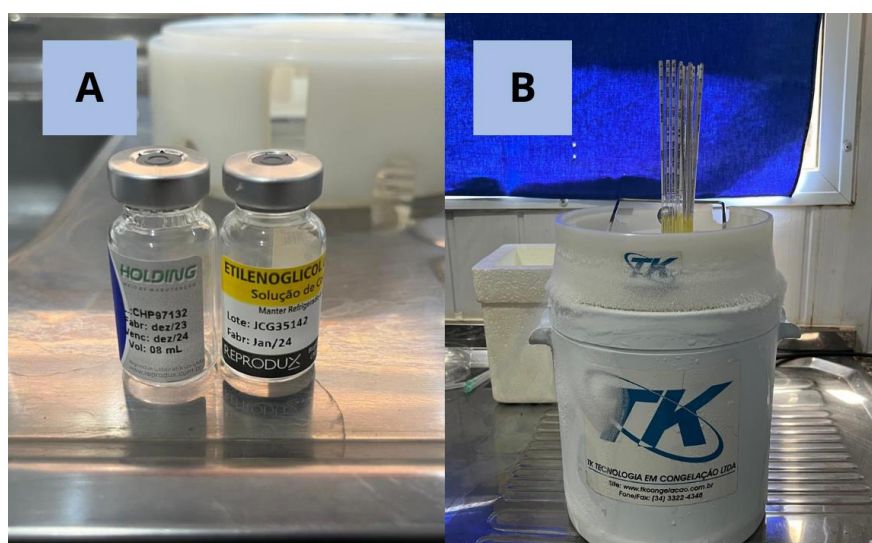
Figura 29 – A. Mesa aquecedora com os meios de manutenção e lavagem. **B.** Embriões de descarte. **C.** Esteromicroscópio e mesa aquecedora.



Fonte: Acervo pessoal (2024).

Por fim, os embriões foram envasados em etilenoglicol, sendo necessário que permanecessem por, no máximo, cinco minutos para evitar a toxicidade do crioprotetor aos embriões. Após esse período, era realizada a criopreservação por Direct Transfer (DT), dessa forma, foram imersos em nitrogênio líquido a aproximadamente -6°C para o equilíbrio, seguido do processo de "seeding" para indução da cristalização da solução crioprotetora e para evitar que o embrião se deslocasse, posteriormente, eram colocados na máquina de congelação (**Figura 30**).

Figura 30 – A. Meio Holding Plus® e Crioprotetor e etilenoglicol. B. Criopreservação por Direct Transfer (DT).



Fonte: Acervo pessoal (2024).

O primeiro uso do Zimbria® ocorreu no mês de setembro de 2024, e observou-se que 75% das vacas apresentaram aumento na produção *in vivo* de embriões. Sendo, EA 5961 e EA 5967, produziram dois embriões a mais em relação ao mês anterior, enquanto a DZ 6061 teve um incremento de três embriões (**Tabela 7**). Os estágios observados foram blastocisto inicial (BI) na vaca EA 5961 e mórula (MO) nas vacas EA 5967 e DZ 6061.

Tabela 7. Médias na produção de embriões *in vivo* com diferentes formulações de FSH (Pluset® e Zimbria®).

	Data da Colheita	
	26/08	26/09
Animais	Embriões DT	
EA5957	0	0
EA5961	2	4 (BI)
EA5967	1	2 (MO)
DZ6061	0	3 (MO)
Média	0,75	2,25

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como resultado, a média da produção de embriões aumentou com o uso do Zimbria® em comparação com o Pluset®, levando a um aumento de 200% na média da produção das doadoras.

$$\text{Taxa de Aumento (\%)} = (\text{Valor Final} - \text{Valor Inicial} / \text{Valor Inicial}) \times 100$$

$$(2,25 - 0,75 / 0,75) \times 100 = 200\%$$

Além disso, o uso do FSH revelou aumento da quantidade de corpos lúteos formados em três das quatro vacas, por conseguinte, foi observado aumento da média de 35% (**Tabela 8**).

$$\text{Taxa de Aumento (\%)} = (\text{Valor Final} - \text{Valor Inicial} / \text{Valor Inicial}) \times 100$$

$$(6,75 - 5 / 5) \times 100 = 35\%$$

Tabela 8. Médias de corpos lúteos (CLs) com diferentes medicamentos (Pluset® e Zimbria®).

	Data da Colheita	
	26/08	26/09
Animais	Quantidade de CL	
EA5957	8	8
EA5961	5	7
EA5967	6	4
DZ6061	1	8
Média	5	6,75

Fonte: Elaborado pelo autor.

Por fim, também pode ser estabelecido a taxa de fecundação (quantidade de embriões/quantidade de CL), no qual foi notado que 75% dos animais obtiveram taxas maiores de fecundação quando administrado o Zimbria®, elevando a taxa de 14,17% para 36,16% (**Tabela 9**).

Tabela 9. Comparação das taxas de fecundação com diferentes medicamentos (Pluset® e Zimbria®).

	Data da Colheita	
	26/08	26/09
Animais	Taxa de Fecundação	
EA5957	0,00%	0,00%
EA5961	40,00%	57,14%
EA5967	16,67%	50,00%
DZ6061	0,00%	37,50%
Média	14,17%	36,16%

Fonte: Elaborado pelo autor.

Apesar do N amostral reduzido indicar a necessidade de administrar o FSH recombinante em outras rotinas, neste relato observaram-se algumas vantagens no uso do Zimbria®, uma vez que, ao contrário de outros produtos à base de FSH disponíveis no mercado que normalmente requerem oito aplicações a cada 12 horas, o Zimbria® necessita de apenas uma única aplicação. Para tanto, fornece uma abordagem mais eficiente e otimiza o manejo reprodutivo.

Além disso, o medicamento contém ripafolitropina alfa bovina (FSH Recombinante) e se destaca por não utilizar matéria-prima de origem animal em seu processo de produção, proporcionando menores custos de produção. Já o Pluset® é um hormônio folículo-estimulante (FSH) exógeno, extraído de gonadotrofinas hipofisárias suínas.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, a significativa recuperação nas taxas de produção, juntamente com a simplificação do protocolo de administração, confirma a eficácia do Zimbria® em comparação ao Pluset® nos animais avaliados e descritos neste relato. O presente relato abre novas possibilidades para a otimização de protocolos de superovulação, mas destaca também a necessidade de investigações mais amplas para validar os achados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARUSELLI, P. S. *et al.* A. Superovulation and embryo transfer in Bos indicus cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 77- 88, 2006

BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J. N. S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 205-211, 2007.

BÉNYEI, B. *et al.* The effect of internal and external factors on bovine embryo transfer results in a tropical environment. **Animal Reproduction Science**, 93(3–4):268–79, 2006.

BINYAMEEN, M.; SALEEM, M.; RIAZ, A. Recent trends in bovine reproductive biotechnologies. **CABI Reviews**, n. 2019, p. 1-10, 2019.

BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Evaluation and classification of bovine embryos.

Animal Reproduction, 10(3):344–8, 2013.

BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 38-48, 2014.

CHOUDHARY, K. K. *et al.* Advances in reproductive biotechnologies. **Veterinary world**, v. 9, n. 4, p. 388, 2016.

DE ALENCAR, M.M. Perspectivas para o melhoramento genético de bovinos de corte no Brasil. **EMBRAPA**. 2004.

ERDEM, H. *et al.* Effect of embryo quality and developmental stages on pregnancy rate during fresh embryo transfer in beef heifers. **Tropical animal health and production**, v. 52, n. 5, p. 2541-2547, 2020.

FERRAZ, P. A. *et al.* Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1834-1841, 2016.

GALLI, C. *et al.* Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 599-616, 2003.

GIMENES, L. U. *et al.* Ciclo estral de bovinos. *In*: LUZ, M.R.; CELEGHINI, E.C.C.; BRANDÃO, F.Z. **Reprodução animal: bovinos, caprinos e ovinos**. 1. ed. São Paulo: Manole. Capítulo 7, 124-155, 2024.

HASLER, J.F., 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, 56(9):1401–15. Hasler, J.F., 2004.

MORAES, J. C. F.; DE SOUZA, C. J. H.; JAUME, C. M. Bovinos: condição corporal e controle da fertilidade. **EMBRAPA**. 2006.

LONERGAN, P. *et al.* State-of-the-art embryo technologies in cattle. **Society of Reproduction and Fertility supplement**, v. 64, p. 315, 2007.

OLIVEIRA, C. S.; SERAPIÃO, R. V.; QUINTÃO, C.C.R. Biotécnicas de reprodução em bovinos. **EMBRAPA**. 2014.

PENITENTE FILHO, J. M. *et al.* PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS IN VIVO E IN VITRO. **Universidade Federal de Viçosa-Departamento de Zootecnia**, 2011.

PHILIPS, P. E., & JAHNKE, M. M. Embryo Transfer (Techniques, Donors, and Recipients). **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 32(2), 365–385, 2016.

PUGLIESI, G. *et al.* Use of color-Doppler ultrasonography for selection of recipients in timed-embryo transfer programs in beef cattle. **Theriogenology**, v. 135, p. 73-79, 2019.

THOMSON, S. P. *et al.* Assessment and selection of the recipient cows' corpus luteum at the time of embryo transfer, and its influence on conception rate. **Australian Veterinary Journal**, v. 99, n. 7, p. 288-292, 2021.

VIANA, J. H. M. Classificação de embriões bovinos produzidos *in vivo*. **EMBRAPA**. 2009.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A. Tecnologia de embriões bovinos. *In*: LUZ, M.R.; CELEGHINI, E.C.C.; BRANDÃO, F.Z. **Reprodução animal: bovinos, caprinos e ovinos**. 1. ed. São Paulo: Manole. Capítulo 7, 124-155, 2024.