



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINARIA

**AVALIAÇÃO DE CORPO LÚTEO E COMPARAÇÃO DAS
TAXAS DE PREENHEZ ENTRE RECEPTORAS PARA
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES CLONES**

Camila Souza Marques
Orientador: Prof. Dr. Ivo Pivato

BRASÍLIA-DF
JUNHO/2017



CAMILA SOUZA MARQUES

**AVALIAÇÃO DE CORPO LÚTEO E COMPARAÇÃO DAS
TAXAS DE PREENHEZ ENTRE RECEPTORAS PARA
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES CLONES**

Trabalho de conclusão de curso de
graduação em Medicina Veterinária
apresentado junto à Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Ivo Pivato

BRASÍLIA-DF
JUNHO/2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Marques, Camila Souza

Avaliação de corpo lúteo e comparação das taxas de prenhez entre receptoras para transferência de embriões clones/ Camila Souza Marques; orientação de Ivo Pivato. – Brasília, 2017.

26 p.:il.

Trabalho de conclusão de curso de graduação – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2017.

Cessão de Direitos

Autor: Camila Souza Marques

Título: Avaliação de corpo lúteo e comparação das taxas de prenhez entre receptoras para transferência de embriões clones

Ano: 2017

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

Camila Souza Marques
Email: camilasmrques@bol.com.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: MARQUES, Camila Souza

Título: Avaliação de corpo lúteo e comparação das taxas de prenhez entre receptoras para transferência de embriões clones

Trabalho de conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aprovado em 26/06/2017

Banca examinadora

Prof. Dr. Ivo Pivato (orientador)

Julgamento: APROVADA

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: 

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

Julgamento: Aprovada

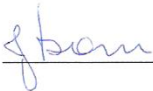
Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: 

Profa. Dra. Juliana Targino Silva Almeida e Macedo

Julgamento: Aprovada

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: 

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer àqueles que sempre estiveram ao meu lado em todas as minhas decisões e momentos difíceis e me apoiaram na escolha da minha profissão, eles são meus alicerces e me ensinaram a ser a pessoa que sou. Obrigada aos meus pais Manoel Ricardo e Lia Maria.

Agradeço a todos que estiveram ao meu lado nessa caminhada, principalmente minha irmã Gabriela, e ao meu namorado Leonardo pela paciência e apoio. Vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

A todos os meus amigos que foram suporte e me proporcionaram momentos inesquecíveis, sempre me dando esperança de ser uma pessoa melhor, em especial a Fabiane, Mariana, Jacqueline, Paula, Michelle, Martha e a todos aqueles do Turuturu.

Ao meu professor orientador, Ivo Pivato. Por toda paciência, e oportunidades que me ofereceu, me fazendo acreditar no meu potencial. Muito obrigada.

A toda equipe da Geneal, que me acolheram e me ensinaram tudo o que podiam, e me fazerem rir sempre. Obrigada pelo exemplo de ética e companheirismo de vocês.

A Deus por me dar a vida e poder viver tudo isso.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. REVISÃO DA LITERATURA	11
1.1. Histórico da clonagem	11
1.2. A clonagem no Brasil	12
1.3. Seleção das Receptoras	13
2. INTRODUÇÃO	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5. CONCLUSÃO	19
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
7. RELATÓRIO DE ESTÁGIO	23
7.1. Introdução	23
7.2. A empresa	23
7.3. Atividades	24
7.4. Conclusão	26

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Relação entre o número de transferências de embrião realizadas no ovário esquerdo de acordo com cada classificação do corpo lúteo e número de prenhez, e suas respectivas taxa de prenhez.....18

TABELA 2 – Relação entre o número de transferências de embrião realizadas no ovário direito de acordo com cada classificação do corpo lúteo e número de prenhez, e suas respectivas taxa de prenhez.....18

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

TN- transferência nuclear

CL- Corpo Lúteo

TE- transferência de embrião

TNCS- transferência nuclear de células somáticas

USP- Universidade de São Paulo

MAPA- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

PGF2 α - prostaglandina F2 α

TETF- transferência de embriões em tempo fixo

P4- progesterona

ECC- escore de condição corporal

N- número

RESUMO

A clonagem animal é um dos maiores avanços na área de biotecnologias da reprodução nos dias de hoje. A eficácia ainda é reduzida, mas se mostra uma ferramenta de melhoramento genético fundamental. Vários fatores atuam para a baixa eficiência, e um fator importante é a escolha e avaliação da receptora do embrião. A avaliação e classificação do corpo lúteo (CL) através de palpação transretal é uma ferramenta importante para avaliar o estado reprodutivo da fêmea bovina. O objetivo desse trabalho foi avaliar e comparar o tipo e localização do CL observados durante a palpação retal de receptoras de embrião clones e relacionar com a taxa de prenhez. Para isso, utilizaram-se cento e dezesseis fêmeas bovinas mestiças como receptoras de embriões clones. Os animais considerados aptos foram aqueles que possuíam CL que se encaixava em alguma das seguintes classificações: incluso, CL com boa massa luteínica interna (> 1,5 cm) ou nenhuma exteriorização; 3, CL com boa massa luteínica interna e boa exteriorização; 2, CL com razoável massa luteínica interna (0,5 a 1 cm) e razoável exteriorização; e 1, CL com pequena massa luteínica interna (< 0,5 cm) e pequena exteriorização. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias depois da transferência. Dos animais inovulados, 59% apresentaram CL no ovário direito e 41% no ovário esquerdo. Foram confirmadas 7 (12,96%) prenhezes em animais com CL classificado como 2; 13 (24%) classificado como 1; 16 (29,6%) prenhezes classificado como 3; e 18 (33,3%) classificado como incluso. Em relação à taxa de prenhez segundo a classificação do CL foram encontrados os valores de 40% (16/40), 40,9% (18/44), 58,3% (7/12) e 65% (13/20) para CL classificado como 3, incluso, 2, e 1 respectivamente. Não houve diferença estatística entre o lado da ovulação e a taxa de prenhez.

Palavras-chave: clonagem, biotecnologia da reprodução, receptora, palpação, prenhez.

ABSTRACT

Animal cloning is one of the greatest advancements in the field of reproductive biotechnology today. Efficiency is still minimized, but it presents a great tool in the fundamentals of genetics. Various factors are to blame for the low efficiency, however one key factor is the evaluation and choosing of the recipient of the embryo. The evaluation and classification of the corpus luteum (CL) through transrectal palpation is an essential tool to evaluate the reproductive status of the female bovine. The objective of this was to evaluate and compare the type and location of CL observed during a rectal palpation of the embryo receptor clones and to also relate with the rate of the pregnancy. For this, one hundred sixteen crossbred bovine females were used as embryo receptor clones. The animals considered fit were those that had CL that fit into any of the following classifications: including, CL with good internal luteal mass (> 1.5 cm) or no exteriorization; 3, CL with good internal luteal mass and good exteriorization; 2, CL with reasonable internal luteal mass (0.5 to 1 cm) and reasonable exteriorization; and 1, CL with small internal luteal mass (< 0.5 cm) and small exteriorization. The diagnosis of gestation was performed 30 days after the transfer. Of the inovulated animals, 59% presented CL in the right ovary and 41% in the left ovary. Seven (12.96%) pregnancies in animals with CL classified as 2 were confirmed; 13 (24%) classified as 1; 16 (29.6%) pregnant classified as 3; and 18 (33.3%) classified as inclusive. Regarding pregnancy rates according to CL classification, 40% (16/40), 40.9% (18/44), 58.3% (7/12) and 65% (13/20) were found for CL classified as 3, inclusive, 2, and 1 respectively. There was no statistical difference between the ovulation side and the pregnancy rate.

Key words: cloning, reproduction biotechnology, recipient, palpation, pregnancy.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 HISTÓRICO DA CLONAGEM

Os primeiros trabalhos de transferência nuclear utilizavam como fonte de núcleos blastômeros de embriões produzidos *in vivo* (NEVES et al., 2010). Em 1938, Speemann propôs a TN a partir da clivagem de um citoplasma enucleado de um zigoto de anfíbio utilizando um fio de cabelo. Mas só em 1952 que Briggs e King realizaram a primeira TN em anfíbios.

Posteriormente, Gurdon e Uehlinger (1966) demonstraram o potencial de reprogramação de células diferenciadas utilizando *Xenopus* adultos. (PEREIRA & FREITAS, 2009). Nos mamíferos, o desenvolvimento desta tecnologia ocorreu mais devagar, as primeiras experiências mal sucedidas no coelho por Bromhall (1975) foram seguidas pela produção de camundongos após a troca pronuclear entre zigotos fertilizados (MCGRATH & SOLTER, 1983 citado por CAMPBELL et al., 2005). O dinamarquês WILLADSEN (1986) foi o primeiro a conseguir resultados animadores com a TN. Utilizou ovócitos de ovelhas maturados *in vivo* e obteve o nascimento de três cordeiros a partir do núcleo de embriões (SOUSA, 2015). Outros pesquisadores obtiveram sucesso usando a técnica de Willadsen, com nascimentos de bovinos e suínos (PRATHER et al., 1989)

Partindo da necessidade de aperfeiçoar a técnica, estudos subsequentes permitiram verificar que células completamente diferenciadas poderiam ser usadas em programas de transferência nuclear. (PEREIRA & FREITAS, 2009). A prova de que era possível clonar um mamífero utilizando células somáticas completamente diferenciadas foi o nascimento da ovelha Dolly (WILMUT et al., 1997 citado por SOUSA, 2015). A transferência nuclear de células somáticas (TNCS) despertou ainda mais o interesse dos pesquisadores, sendo relatada com êxito em diversas espécies (SOUSA, 2015), como em bovinos (CIBELLI et al., 1998; KATO et al., 1998), suínos (BETHAUSER et al., 2000), equinos (GALLI et al., 2003), camundongos (WAKAYAMA et al., 1998), caprinos (BAGUISI et al., 1999), cães (LEE et al., 2005), gatos (SHIN et al., 2002) e bubalinos (SHIN et al., 2007).

1.2 A CLONAGEM NO BRASIL

No Brasil, o primeiro animal produzido por transferência nuclear foi a bezerra Vitória, no dia 17 de março de 2001, pela equipe da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), foi o primeiro clone latinoamericano (RUMPF, 2001 *apud* RODRIGUES & RODRIGUES). Utilizaram-se células embrionárias e citoplasma de ovócitos pré-ativados, em que a enucleação foi realizada em telófase II (Souza et al., 2000). No dia 27 de abril de 2002, na Fazenda Panorama (Monte-Mor, SP), nasceu o primeiro clone a partir de célula diferenciada jovem (fibroblasto fetal), o Marcolino da Universidade de São Paulo (USP) (MELLO, 2003).

Em julho de 2002, na cidade de Jaboticabal em São Paulo, nasceu o primeiro clone a partir de célula diferenciada adulta, a Penta. Em 2003 nasceu a Bela da USP (VISINTIN et al., 2008). Em 2003, nasceu a bezerra Lenda, clonada a partir de células da granulosa oriundas de um óvulo retirado do ovário de uma vaca morta (IGUMA et al., 2003 *apud* NEVES et al., 2010). Em fevereiro de 2004, nasceu o primeiro clone da América Latina feito a partir de células retiradas da orelha de outro clone (Vitória), produzido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, chamada Vitoriosa. (NEVES et al., 2010).

Em abril de 2005, nasceram os clones bovinos Porã e Potira, a partir de células somáticas isoladas de um pedaço de pele da orelha de uma mesma vaca doadora. São da raça Junqueira que faz parte do Programa de Conservação e Uso de Recursos Genéticos Animais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, e representam um exemplo de sucesso da integração entre o projeto de conservação de recursos genéticos animais e a moderna biotecnologia animal. (EMBRAPA, 2005). No dia 23 de abril de 2013, nasceu nas dependências do Centro de Transferência de Tecnologias de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira (CTZL) da Embrapa Cerrados (Planaltina-DF), localizado no Gama (DF), a bezerra Brasília. Ela é produto da TN utilizando células do tecido adiposo, sendo essa a primeira experiência bem-sucedida utilizando esse tipo de célula (EMBRAPA, 2013).

Além dos clones produzidos pela Embrapa e por Instituições de pesquisa, há no Brasil empresas que realizam a produção de clones

comercialmente, como a In Vitro Clonagem Animal, Vitrogen em parceria com a USP- Campus Pirassununga, e a Geneal que após a legalização do registro de animais clonados junto às Associações de Criadores, devido à homologação do regulamento do Serviço de Registro Genealógico das Raças Zebuínas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), em maio de 2009, vem oferecendo essa inovação ao mercado (ANTES, 2014).

1.3 SELEÇÃO DAS RECEPTORAS

A clonagem é resumidamente dividida em: retirada do núcleo do ovócito receptor, preparação e transferência do núcleo da célula doadora, fusão dos dois componentes, ativação do complexo reconstruído, cultivo temporário dos embriões reconstruídos e transferência para a receptora ou armazenagem em nitrogênio líquido (NIEMANN et al., 2008).

A parte em que o embrião é reconstituído e inicia a maturação ocorre em laboratórios com instrumentos específicos e ambientes altamente controlados, depois o embrião é preparado para ser implantado no útero de uma vaca receptora até seu desenvolvimento completo e parto, realizado em fazendas ou centrais de receptoras. A escolha das receptoras é de fundamental importância para o sucesso da TE. A taxa de prenhez após a transferência de embrião é muito influenciada pelas condições e pela preparação das receptoras. Fêmeas selecionadas para serem receptoras devem ser boas reprodutoras, com trato genital livre de infecção, ciclo estral de duração normal e boa condição corporal. (HAFEZ, 2004)

A receptora é submetida a um protocolo de sincronização de estro para receber o embrião. O uso do protocolo tem o objetivo de deixar a receptora na fase do ciclo estral compatível com a fase do desenvolvimento embrionário (MARQUES et al. citado por BARREIROS, 2006).

Os protocolos de sincronização incluem o uso de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) ou seus análogos sintéticos (MARQUES et al., 2004 citado por BARREIROS, 2006). Estudos mostraram que o intervalo entre o tratamento com PGF e a manifestação do estro é determinado pelo estágio de desenvolvimento do folículo dominante no momento do tratamento, sendo eficaz apenas para a

indução do estro, sem controlar o crescimento folicular, podendo reduzir o aproveitamento das fêmeas tratadas. (BARREIROS, 2006). O protocolo de PGF2 α , consiste em duas doses com intervalos de 11 a 14 dias. Se todas receptoras estiverem ciclando, cerca de 80% apresentarão sinais de estro cinco dias após o tratamento (BÓ et al., 2004).

Outro protocolo utilizado para a sincronização de estro em receptoras é o uso de implantes de progesterona associado ao uso de estradiol e luteolíticos. O uso desse protocolo permitiu a transferência de embriões em tempo fixo (TETF) sem observação de cio, necessitando apenas da avaliação do CL no momento da inovulação dos embriões. (BARUSELLI et al., 2000 citado por BARREIROS, 2006). Com o intuito em melhorar o rendimento dos protocolos buscam-se alternativas hormonais que aumentem as taxas de aproveitamento de receptoras. Tem-se empregado o uso de eCG, que tem função de provocar a indução de um CL acessório através da indução da ovulação do folículo dominante (PFEIFER et al., 2002), aumentando a concentração plasmática de progesterona.

No dia da inovulação, faz-se uma criteriosa avaliação onde será verificada a presença, localização e características morfológicas do CL. Essa avaliação ocorre por palpação retal. A caracterização do CL fornece informações importantes sobre o estado reprodutivo da fêmea bovina possibilitando a adequação de procedimentos de manipulação ou sincronização do ciclo estral (VIANA et al., 1999). A seleção das receptoras no dia da transferência de embriões geralmente é realizada levando-se em consideração o tamanho do CL à palpação transretal. Este método, apesar da praticidade e facilidade de execução, apresenta limitação na avaliação, devido sua baixa sensibilidade e especificidade (SPRECHER et al., 1989). VIANA, 1996 descreveu que a projeção do CL não é confiável, pois o animal pode possuir pequena projeção de CL, e grande parte pode estar embebida no estroma ovariano, e um animal com CL de grande projeção, pode ter uma massa total pequena devido a pequena porção interna.

A importância da avaliação do CL é devido à produção de progesterona (P4) ocorrer por esta estrutura. A P4 controla mudanças no ambiente uterino e influencia o crescimento embrionário (REIS, 2006).

2. INTRODUÇÃO

A clonagem animal é um dos maiores avanços na área das biotecnologias da reprodução nos dias de hoje. A principal técnica utilizada para a clonagem é a transferência nuclear (TN), que consiste na fusão do núcleo de uma célula de um animal doador, em um citoplasma de um ovócito enucleado de um animal receptor, permitindo a criação de um animal com genótipo idêntico ao animal doador.

A técnica de TN está inserida no contexto das biotecnologias da reprodução animal e suas aplicações podem beneficiar, também, estudos na medicina, na conservação animal e na ciência básica, como a diferenciação celular, manipulação de genoma e herança citoplasmática. (NEVES et al., 2010).

A clonagem deixou os centros de pesquisa e difundiu-se entre empresas privadas no mundo todo, tornando-se uma opção acessível para alguns produtores de bovinos que procuram preservar a genética de alguns animais com características especiais e alto valor zootécnico.

A eficácia ainda é reduzida, mas se mostra uma ferramenta de multiplicação genética fundamental, isso porque proporciona multiplicação rápida de indivíduos geneticamente superiores, já que a prolificidade de bovinos é menor, o que demanda mais tempo para obter resultados de melhoramento genético em um rebanho utilizando outras biotecnologias da reprodução.

Vários fatores atuam para a baixa eficiência, tais como os parâmetros biológicos relacionados à interação do ciclo celular da célula doadora de núcleo e do citoplasma receptor, o procedimento de ativação artificial ou as condições de cultivo *in vitro* dos embriões reconstruídos (HEYMAN, 2005). Um dos fatores que é fundamental, mas às vezes desconsiderado pelos médicos veterinários responsáveis pela técnica, é a avaliação do corpo lúteo (CL) da receptora no momento da transferência do embrião (TE).

A caracterização do CL fornece informações importantes sobre o estado reprodutivo da fêmea bovina possibilitando a adequação de procedimentos de manipulação ou sincronização do ciclo estral (VIANA et al., 1999). A seleção das receptoras no dia da transferência de embriões geralmente é realizada

levando-se em consideração o tamanho do CL à palpação transretal. Este método, apesar da praticidade e facilidade de execução, apresenta limitação na avaliação, devido sua baixa sensibilidade e especificidade (SPRECHER et al., 1989).

O objetivo desse trabalho foi avaliar e comparar o tipo e localização do CL observados durante a palpação retal de receptoras bovinas e relacionar com a taxa de prenhez, a fim de obter resultados que demonstrem a importância de escolher corretamente a receptora do embrião clonado. Os animais participaram do protocolo de TE na propriedade da Geneal-Genética e Biotecnologia Animal, localizada na cidade de Uberaba-MG.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo no município de Uberaba-MG, com dados de janeiro a abril de 2017. Foram utilizadas 116 receptoras de embrião mestiças, selecionadas através da avaliação do escore de condição corporal (ECC), avaliação ginecológica por palpação retal, exame de Brucelose negativo, quarentena e com porte capaz de sustentar gestação de clone. Após estas avaliações, os animais eram submetidos a um protocolo hormonal para sincronização da ovulação. O protocolo iniciava com colocação de um dispositivo intravaginal de progesterona + 2 ml de Benzoato de estradiol, oito dias após, o implante era retirado e aplicava-se 2 ml de PGF2 + 2 ml de eCG + 0,5 ml de cipionato de estradiol, a transferência era realizada nove dias após.

No dia da TE, as receptoras eram avaliadas por palpação transretal, com avaliação da presença, localização e classificação do CL. Os animais considerados aptos foram aqueles possuíam CL que se encaixava em alguma das seguintes classificações: incluso, CL com boa massa luteínica interna (> 1,5 cm) ou nenhuma exteriorização; 3, CL com boa massa luteínica interna e boa exteriorização; 2, CL com razoável massa luteínica interna (0,5 a 1 cm) e razoável exteriorização; e 1, CL com pequena massa luteínica interna (< 0,5 cm) e pequena exteriorização. Após a palpação, os animais com CL receberam anestesia peridural baixa com Lidocaína 2% sem vaso constritor para evitar movimentação, a TE foi no corno uterino ipsilateral ao ovário com CL.

O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a transferência dos embriões com o auxílio de ultrassonografia.

Utilizou-se a estatística descritiva seguida pelo teste de normalidade D'Agostino-Pearson omnibus, seguido do teste Mann Whitney para comparação entre dois grupos no programa GraphPad Prism ® 6. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão da média, e $P \leq 0.05$ considerado significativo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 116 vacas inovuladas, 59% apresentaram CL no ovário direito (n=68), e 41% no ovário esquerdo (n= 48). HAFEZ (1995) citado por LEAL (2009) diz que a ovulação ocorre mais frequentemente no ovário direito (60%) que no ovário esquerdo (40%). Quanto a classificação dos CL, 37,5 % (n=18) dos animais com ovulação no lado esquerdo apresentaram classificação 3; 12,5% (n=6) classificação 2; 14,6% (n=7) classificação 1 e 35,4% (n=17) classificação incluso. Em relação ao ovário direito, 32,4% (n=22) apresentaram CL classificado como 3; 8,8% (n=6) CL classificado como 2; 19,1% (n=13) classificado como 1 e 39,7% (n=27) classificado como incluso. Observou-se predominância de estruturas com boa massa luteínica (>1,5 cm) como achado no estudo realizado por LEAL (2009) que classificou os CL's em pequeno, médio e grande levando em consideração a projeção e assimetria dos ovários, os resultados foram 18,3% (11/60) considerados pequenos, 33,3% (20/60) médios e 48,3% (29/60) grandes.

Das 116 receptoras inovuladas, 46,55% (n=54) tiveram a prenhez confirmada 30 dias após a transferência dos embriões. Dessas, 21 (39%) possuíam CL no ovário esquerdo e 33 (61%) no ovário direito. Foram confirmadas 16 (13,8%) prenhez em animais com CL classificado como 3; 7 (6,05%) prenhez classificado como 2; 13 (11,2%) classificado como 1 e 18 (15,5%) classificado como incluso.

Em relação à taxa de prenhez segundo a classificação do CL foram encontrados os valores de 40% (16/40), 58,3% (7/12), 65% (13/20) e 40,9% (18/44) para CL classificado como 3, 2, 1 e incluso respectivamente.

A Tabela 1 refere-se à taxa de prenhez dos animais com CL localizados no ovário esquerdo relacionado com o número total de inovulações realizadas no período do estudo. A Tabela 2 refere-se à taxa de prenhez dos animais com CL localizados no ovário direito. Não foi observado diferença estatística entre o lado da ovulação e a taxa de prenhez, $p > 0,05$.

TABELA 1 – Relação entre o número de transferências de embrião realizadas no ovário esquerdo de acordo com cada classificação do corpo lúteo e número de prenhez, e suas respectivas taxa de prenhez.

Classificação do CL	Nº de TE	Nº de prenhez	Taxa de prenhez (%)
CL 3	18	8	6,9
CL 2	6	3	2,6
CL 1	7	3	2,6
CL incluso	17	7	6,0
Total	48	21	18,1

TABELA 2 – Relação entre o número de transferências de embrião realizadas no ovário direito de acordo com cada classificação do corpo lúteo e número de prenhez, e suas respectivas taxa de prenhez.

Classificação do CL	Nº de TE	Nº de prenhez	Taxa de prenhez (%)
CL 3	22	8	6,9
CL 2	6	4	3,4
CL 1	13	10	8,6
CL incluso	27	11	9,5
Total	68	33	28,4

Com relação à taxa de prenhez segundo a classificação do CL à palpação transretal, não houve influência do tamanho do CL nas taxas de prenhez. LEAL (2009) também não observou diferença entre as taxas de prenhez de acordo com o tamanho do CL à palpação transretal, verificando que a seleção das receptoras pela projeção do CL não foi efetiva em estimar a taxa de gestação nos diferentes grupos.

ANDRADE (2012) também não encontrou relação entre o lado da ovulação e a taxa de prenhez em receptoras de embriões produzidos *in vitro*.

DEMCZUK et al. (1998) citado por ANDRADE (2012) relata haver maior número de ovulações no lado direito (36,0% para o lado esquerdo e 64,0% para o lado direito), não afetando, porém, a taxa de prenhez.

5. CONCLUSÃO

São observados maior formação de corpo lúteos com boa massa luteínica (> 1,5 cm) com boa ou nenhuma exteriorização, porém não há relação com a taxa de prenhez. De acordo com os resultados obtidos, não há relação entre o lado da ovulação com a taxa de prenhez de receptoras de embriões clones, assim como observado para receptoras de embriões não clones. As ovulações ocorrem com mais frequência no ovário direito, mas sem interferir na taxa de prenhez. Os dados observados para receptoras de embriões clones assemelham-se aos dados relatados em literatura de receptoras de embriões não clones.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, et al. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.36, n.1, p.66-69, jan./mar. 2012.

ANTES, R. S. **Clonagem por transferência nuclear**. Monografia- Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014.

BARBOSA, M. C. **Clonagem em bovinos: descrição das principais anomalias/ Cloning in cattle: description of the main anomalies**. Monografia apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014.

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. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 657-664, out./dez. 2006.

BÓ, G.A.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; BARUSELLI, P.S. & REIS, E.L. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, 32 (Supl): p.1-22, 2004.

CAMPBELL, K. H. S.; ALBERIO, R.; CHOI, I.; FISHER, P.; KELLY, R. D. W.; LEE, J. H. & MAALOUF, W. Cloning: eight years after Dolly. **Reproduction in domestic animals**, v. 40, n. 4, p. 256-268, 2005. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2005.00591.x/full>. Acesso em: 31/05/2017

CHAVES, D. F.; ALVES, M. J. **Protocolo de receptoras de embriões: Índices de aproveitamento de corpo lúteo e taxas de prenhez**. Disponível em http://nippromove.hospedagemdesites.ws/anais_simposio/arquivos_up/documentos/artigos/24e86ba499d0ef87bb84ab19053fd2c9.pdf. Acesso em: 31/05/2017.

EMBRAPA (BR), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Embrapa promove dia de campo sobre reprodução animal**. Brasília: Embrapa, 2005. Disponível em: <https://www.embrapa.br/web/portal/busca-de-noticias/-/noticia/17977264/embrapa-promove-dia-de-campo-sobre-reproducao-animal/>. Acesso em: 31/05/2017.

EMBRAPA (BR), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: **Bezerra Brasília é o novo clone da Embrapa**. Brasília: Embrapa, 2013. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cerrados/busca-de-noticias/-/noticia/1491024/bezerra-brasil-e-o-novo-clone-da-embrapa>. Acesso em: 31/05/2017.

HAFEZ, E. S. E., HAFEZ, B., **Reprodução Animal**. 7ª edição, Editora Manole, Barueri - SP, 2004, p. 429.

HEYMAN, Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, n. 3, p. 353-362, 2005. Disponível em <https://rnd.edpsciences.org/articles/rnd/pdf/2005/03/r5312.pdf>. Acesso em: 30/05/2017

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

MELLO, M. R. B. **Clonagem em bovinos: uso de fibroblastos fetal e adulto como fonte doadora de núcleo**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2003.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, p.414-421, 2010 (supl. especial).

NIEMANN, H. et al. Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. **Reproduction**, v. 135, n. 2, p. 151-163, 2008. Disponível em: <http://www.reproduction-online.org/content/135/2/151.full.pdf+html>. Acesso em: 30/05/2017

PEREIRA, A. F.; FREITAS, V. J. F. Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n. 3, p.118-128, 2009.

PRATHER, R. S.; SIMS, M. M.; FIRST, N. L. Nuclear transplantation in early pig embryos. **Biology of reproduction**, v. 41, n. 3, p. 414-418, 1989.

RODRIGUES, J. L.; DE ÁVILA RODRIGUES, B. Evolução da biotecnologia da reprodução no Brasil e seu papel no melhoramento genético. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p. 428-436, 2009.

SOUSA, D. B. **Clonagem por Transferência Nuclear: histórico, aplicações potenciais e principais células doadoras de núcleo**. Monografia- Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2015.

SPRECHER, D. J.; NEBEL, R. L; WHITMAN, S. S. The predictive value, sensitivity and specificity of palpation per rectum and transrectal ultrasonography for the determination of bovine luteal status. **Theriogenology**, v. 31, p. 1165-1172, 1989.

VIANA, J. H. M. **Avaliação ultra-sonográfica de estruturas ovarianas em doadoras e receptoras de embrião**. Viçosa, 1996. 120 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Zootecnia, Viçosa, MG. Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, p. 251-256, 1999.

VISINTIN, J.A.; MELLO, M. R. B.; MILAZZOTTO, M. P.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. Biotecnologias da reprodução animal, Clonagem e transgenia animal. **Ciência veterinária Tróp**, v. 11, suplemento 1, p.139-144, 2008.

7. RELATÓRIO DE ESTÁGIO

7.1 INTRODUÇÃO

O estágio foi realizado na Geneal-Genética e Biotecnologia Animal, situada no município de Uberaba-MG, no período de 06 de fevereiro a 05 de maio do ano de 2017, tendo como orientador o Médico Veterinário Henrique Bayão, formado na UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais).

O estágio proporcionou aprendizado em diversas áreas da produção e manejo reprodutivo de bovinos de diferentes raças.

As atividades realizadas incluíam diagnóstico de gestação, exame físico de bezerras clones, tratamento de diversas patologias em vacas e bezerras, transferência de embriões, e diversas outras atividades que serão abordados nesse relatório.

7.2 A EMPRESA

A Geneal-Genética e Biotecnologia Animal está localizada no município de Uberaba-MG e foi fundada em 2009 pela Brasif (Grupo empresarial). Possui um laboratório de última geração e corpo técnico com experiência em Fertilização *In Vitro* (FIV) e clonagem.

A empresa foi pioneira em clonagem de bovinos no Brasil, e tem como missão *“gerar inovação tecnológica voltada à competitividade da pecuária e ao bem estar da população brasileira, notadamente em biotecnologias de ponta.”*

A empresa possui em sua sede laboratório onde são realizadas pesquisas, produção de embriões in vitro e outras atividades, e o escritório da empresa. A fazenda onde os animais estão localizados fica no mesmo território que a sede. O responsável técnico da fazenda é o Médico Veterinário Henrique Bayão, e os funcionários, Leonardo Gonçalves (medico veterinário trainee), Claudinei (gerente), Leandra (escritório), José Eurípedes (tratorista), José Antônio e Luiz Gustavo (serviços gerais).

A empresa recebe sempre estagiários de estágio supervisionado sendo no máximo três por vez. Possui um alojamento em que ate dois alunos podem

ficar. Os estagiários recebem atividades diversas, afim de que ponham em pratica tudo aquilo que foi aprendido durante o curso.

7.3 ATIVIDADES

O estágio foi realizado do dia 06 de fevereiro ao dia 05 de maio de 2017. As atividades tinham início às 7h e término geralmente após as 17h. No primeiro dia, houve apresentação das instalações da propriedade, dos funcionários e das atividades realizadas.

As bezerras clones eram examinadas regularmente, e recebiam a partir do terceiro dia de nascida 20 ml de Glicopan (suplemento vitamínico) + Zinco, todos os dias até completarem 60 dias. Algumas bezerras com alterações de pele, como perda de pelos, e crostas, recebem o dobro de zinco.

Além do acompanhamento diário dos animais nascidos na propriedade, vacas com qualquer tipo de alteração ficavam em piquete reservado denominado enfermaria. Os animais apresentavam diversas enfermidades como:

- Claudicação por dermatite digital causada principalmente por *Fusobacterium necrophorum*. O tratamento feito era casqueamento após a limpeza do casco, bandagem com aplicação de pasta formada por Unguento (ação cicatrizante e repelente) + sulfato de cobre + terramicina em pó. Hiperplasia interdigital, com tratamento igual ao de dermatite digital.
- Vacas que abortaram eram palpadas para acompanhamento da involução uterina, e algumas apresentavam retenção de placenta. O tratamento era feito com 4 ml de Prostaglandina para promover contração uterina quando o útero estava flácido, 5 ml de Benzoato de Estradiol para abertura de cérvix e 50 ml de Terramicina LA todos pela via intramuscular.
- Animal com otohematoma e miíase. Tratamento feito com limpeza da ferida com degermante, aplicação de Tanidil (matabicheira) e prata (repelente). Quando a ferida não tinha mais secreção só aplicava o repelente de moscas.
- Deiscência de sutura em alguns animais após cesariana. O tratamento era feita com limpeza da ferida com degermante, aplicação de Tanidil quando havia miíase, e repelente.

- Compressão do nervo radial em animal que caiu no troco durante auxílio do parto. Tratamento com soro oral (cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, propilenoglicol e água), Monovim B1, Terramicina LA e Cortvet. O animal veio a óbito.

- Miíase em diversos animais e em diferentes locais. O tratamento era feito com limpeza da região, retirada das larvas e aplicação de Tanidil e Prata.

Os animais da propriedade (exceto clones) que apresentassem qualquer alteração de saúde eram destinados para a enfermaria e só retornavam ao lote de destino quando não apresentassem mais nenhum problema.

Todos os clones eram pesados uma vez ao mês, e desmamados quando atingiam 200 kg. As bezerras acima de 90 dias eram vacinadas contra Raiva, Brucelose e Clostridiose. Alguns animais apresentaram sintomas de Tristeza Parasitária (Babesiose e Anaplasmosse) e foram tratados com Imizol e Kinectomax, e os que apresentavam febre recebiam 10 ml de Dipirona.

A fazenda recebe receptoras oriundas de central de receptoras, e todas elas ao chegarem à propriedade eram examinadas com Ultrassom para diagnóstico de prenhez e coletado o sangue para realização de exame de brucelose. Esses animais ficavam em piquete isolado em quarentena.

Foram realizadas 22 cesarianas, todas com animal em estação, contido no tronco, com acesso pelo flanco. Depois de contido, o animal era palpado, seguia com tricotomia ampla no flanco e anestesia local com Lidocaína. Assepsia com degermante e álcool. Incisão oblíqua e prosseguia de acordo com a técnica descrita na literatura. Foram realizados também 11 partos normais, dos quais 8 necessitaram de auxílio com cordas. As cordas eram posicionadas nos membros dos fetos e tracionadas por pessoas.

Foram realizadas 155 transferências de embriões divididas em 6 dias, todas as transferências foram realizadas pelo Médico Veterinário Henrique Bayão. Antes de receberem os embriões, as vacas recebiam protocolo hormonal para sincronização da receptora com o embrião.

O protocolo iniciava com colocação de um dispositivo intravaginal de progesterona + 2 ml de Benzoato de Estradiol, oito dias após o implante era retirado e aplicava-se 2 ml de PGF2 + 2 ml de eCG + 0,5 ml de Cipionato de

Estradiol e a transferência realizada nove dias após nas vacas que eram consideradas aptas através de palpação retal. O diagnóstico de gestação era realizado 30 dias após a transferência.

Coletou-se célula de quatro animais diferentes para clonagem, em duas propriedades distintas. Para coleta, o animal é contido em tronco, e administrado 2 a 3ml (a depender da raça do animal) de Lidocaína no espaço epidural. A cauda era erguida e amarrada, seguia a tricotomia na região da prega caudal, e anestesia local com lidocaína. Assepsia com degermante e álcool. Com pinça de Allis segurava um pedaço de pele abaixo da cauda e com bisturi retira um pedaço. A amostra de pele era lavada com PBS com auxílio de seringa, depois colocado em tubo com PBS e agitado, trocava de tubo e repetia o procedimento e por último, colocava em tubo com meio de transporte que pode ser PBS ou até soro fisiológico. Fez sutura de pele com ponto simples separado. A amostra era armazenada em caixa de isopor com gelo ate chegar ao laboratório onde passa por tratamento para isolamento da célula ou congelamento do tecido.

7.4 CONCLUSÃO

O Estágio Curricular Supervisionado é uma ferramenta fundamental para preparar o aluno para o exercício da profissão.

O estágio permite expandir o conhecimento sob diversas áreas da produção de bovinos, dentre ela a clínica e reprodução desses animais. A busca pelo aprendizado era estimulada com frequência através de perguntas realizadas pelo orientador, e trabalhos enviados para serem realizados em casa.

Além de conhecimento, o estágio permite conhecer as limitações do aluno e trabalhar o psicológico em situações que exigem decisões e ações rápidas. Permite o relacionamento com pessoas envolvidas em diferentes áreas da pecuária brasileira, como proprietários, veterinários e funcionários.

A experiência do estágio promove a chance de colocar em prática os aprendizados adquiridos em sala de aula durante o curso e a preparação para o mercado de trabalho que esta cada vez mais exigente e necessita de profissionais diferenciados.