



3 ADOTAR UM PROGRAMA DE MULTIPLICAÇÃO DE FÊMEAS DE GENÉTICA SUPERIOR POR SUPEROVULAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (TE) OU PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)

As biotécnicas da reprodução podem ser utilizadas para a multiplicação de animais de genética superior do rebanho. Enquanto a inseminação artificial permite a multiplicação de filho(a)s de touros superiores para a melhoria do rebanho, a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) permitem a multiplicação do(a)s filho(a)s das melhores fêmeas do rebanho, acasaladas com os melhores touros disponíveis no mercado, tendo como resultado o melhoramento mais rápido do rebanho.

Espécies que normalmente têm uma cria por gestação, como o caso da vaca, são chamadas uníparas. Estas espécies



possuem um grande número de folículos (estruturas que contêm o ócito ou óvulo) nos ovários, porém um mecanismo fisiológico faz com que tenham apenas uma ovulação a cada ciclo estral. Dessa forma, após o cio, caso haja a cobertura ou inseminação da fêmea, será formado apenas um embrião, que, por sua vez, formará o feto e dará origem a um bezerro. A descoberta dos hormônios que controlam este mecanismo possibilitou o desenvolvimento de tratamentos para induzir várias ovulações no mesmo momento. Assim, uma vaca que teria apenas uma ovulação (e, conseqüentemente, apenas um embrião) após o cio, pode ser induzida a ter múltiplas ovulações (processo conhecido como superovulação) e, com isso, desenvolver vários embriões.

O útero de uma vaca, contudo, está preparado para suportar a gestação de apenas um feto. Ainda que possam ocorrer gestações gemelares e, excepcionalmente, até de trigêmeos, as chances de complicações na gestação ou parto e a baixa viabilidade dos bezerras nascidos fazem com que estas possibilidades sejam indesejáveis em bovinos. No caso de tratamentos hormonais para indução da superovulação, o número de embriões gerados torna a gestação inviável. O embrião de uma fêmea, contudo, pode se desenvolver no útero de outra, desde que elas estejam na mesma fase do ciclo estral, ou seja, que a ovulação tenha ocorrido no mesmo dia ou em dias próximos. Dessa forma, os embriões gerados após um processo de superovulação podem ser removidos (ou coletados) do útero de uma vaca ou novilha, denominada “doadora de embriões”, e transferidos para outra, chamada “receptora de embrião”. Como o embrião foi formado pela união do ócito da doadora com um espermatozóide do touro usado para a inseminação ou cobertura, a receptora não contribui com nenhuma característica genética do bezerro. Um embrião coletado de uma vaca holandesa, inseminada com um touro holandês, dará origem a um bezerro também desta raça, mesmo sendo gestado por uma receptora nelore, por exemplo.

A técnica hoje conhecida por transferência de embriões (ou simplesmente TE) envolve basicamente um tratamento hormonal para indução da superovulação, seguido da inseminação ou cobertura da doadora e, seis a sete dias depois, pela colheita dos embriões produzidos. Paralelamente, as receptoras têm seu ciclo estral sincronizado, para que no momento da coleta estejam aptas a receber os embriões recuperados. Os embriões também podem ser congelados em nitrogênio líquido, de forma semelhante ao que é feito com o sêmen, por períodos indeterminados. O estabelecimento do protocolo de superovulação e a realização dos procedimentos de coleta e transferência de embriões só podem ser feitos por médicos veterinários especializados nesta área. Esses profissionais também participam da identificação das potenciais doadoras de embrião, da definição da estratégia de trabalho e da análise dos resultados obtidos.

Recentemente foi viabilizado o uso, em escala comercial, de outra técnica, denominada de produção *in vitro* de embriões (PIVE). Essa técnica baseia-se – diferentemente do processo

utilizado na múltipla ovulação –, na aspiração de ócitos diretamente do ovário das vacas, em qualquer dia do ciclo estral, com o uso de equipamentos especiais. Esses ócitos são levados ao laboratório, onde serão submetidos a diferentes processos que resultarão na PIVE, e esses embriões, como na TE, serão transferidos para receptoras. A técnica é chamada de produção *in vitro* porque os ócitos e embriões se desenvolvem fora do animal, em incubadoras no laboratório, isto é, *in vitro*, até que atinjam estágio apropriado para serem transferidos para as receptoras. Apesar das biotécnicas de TE e PIVE envolverem diferentes processos, seu objetivo é semelhante, ou seja, produzir grande número de embriões de uma mesma vaca e, assim, aumentar o número de filhos que ela pode ter durante a vida.

3.1 AVALIE O MERCADO OU A NECESSIDADE INTERNA DO REBANHO

Antes de se iniciar um programa de multiplicação de fêmeas é fundamental a análise do mercado e/ou da necessidade interna do rebanho.

Num rebanho em que se pretenda implantar um processo de seleção, podem ser adotadas a TE ou a PIVE como ferramentas de aceleração desse processo, permitindo a multiplicação das melhores fêmeas do plantel. Contudo, a implantação dessas técnicas deve basear-se em análise de mercado, em que seja avaliado o custo de produção desses animais, que deve ser comparado com o custo de aquisição de um animal de mesmo potencial em outros rebanhos selecionados.

Por outro lado, em rebanhos selecionados, um programa de multiplicação de fêmeas pode ser adotado com o objetivo de disponibilizar maior número de animais para venda. Esses animais terão maior valor agregado, pois serão filhos das vacas de melhor desempenho e produção do rebanho. Assim, a decisão sobre a adoção da técnica deve basear-se nas necessidades dos rebanhos e no mercado, devendo ser avaliada caso a caso, de acordo com a localização da propriedade, a raça utilizada, o preço de mercado dos animais, os potenciais compradores e fornecedores etc.

3.2 ANALISE AS CONDIÇÕES TÉCNICAS DA PROPRIEDADE

Para que a adoção dessas biotécnicas obtenha sucesso, é necessário, também, avaliar as condições técnicas da propriedade. Tal procedimento objetiva avaliar a propriedade não só com relação à estrutura e instalações necessárias e adequadas para a condução das atividades das biotécnicas, mas também com relação ao tipo de manejo adotado nas vacas do rebanho. Essa avaliação do manejo é realizada para verificar se os animais multiplicados terão condição de expressar seu potencial genético e alcançar a produção esperada. Como citado anteriormente no capítulo sobre melhoramento genético, as condições ambientais (manejo, nutrição, temperatura, instalações etc.) limitam a expressão do potencial genético dos animais. Assim, algumas vezes é necessário investir inicialmente

na melhoria do manejo, da nutrição e das instalações, para que, então, possam ser adotadas, com sucesso, biotécnicas como a TE e a PIVE.

3.3 CONTRATE O SERVIÇO ESPECIALIZADO

Os procedimentos relativos à condução de um programa de multiplicação de animais pelo uso da TE ou da PIVE são realizados exclusivamente por médico veterinário especialista. A adoção de tal programa exige, assim, a contratação desse profissional. Atualmente, podem ser contratadas empresas especializadas ou veterinários autônomos.

3.4 IDENTIFIQUE AS DOADORAS EM POTENCIAL

Após a contratação do veterinário, o próximo passo é a identificação das doadoras em potencial, selecionadas inicialmente por seu mérito, ou seja, por serem grandes produtoras de leite ou por possuírem características morfológicas que as destacam dentro do padrão racial. Após essa seleção fenotípica, o veterinário deve avaliar o histórico reprodutivo de cada animal e proceder à avaliação ginecológica, para diagnosticar sua situação reprodutiva e recomendá-la ou não como doadora de oócitos (no caso da PIVE) ou de embriões (no caso da TE).

3.5 FAÇA O ACASALAMENTO ADEQUADO DAS DOADORAS

Além da seleção de doadoras, é necessário realizar um adequado acasalamento. Alguns critérios de seleção de touros para acasalamento já foram discutidos no capítulo II – “Melhoramento genético”. A escolha do touro adequado para a fêmea é ponto de extrema importância para o sucesso do programa, em que são observados, além dos aspectos produtivo e morfológico, aspectos econômicos e comerciais, de acordo com o objetivo da seleção. Recomenda-se a contratação de técnico especializado em acasalamento genético, que possua bom conhecimento da raça que está sendo trabalhada e dos touros com sêmen disponível para venda.

3.6 DEFINA A ESTRATÉGIA PARA AS RECEPTORAS

As receptoras representam um dos maiores custos de um programa de multiplicação de animais superiores. Os custos são decorrentes de sua compra e, também, da manutenção, que, além da alimentação, envolve a implementação de manejo sanitário, com a realização de exames e vacinação contra as principais doenças que afetam a reprodução, conforme orientação do médico veterinário que esteja acompanhando a implementação do programa no rebanho.

3.6.1 USE RECEPTORAS DO PRÓPRIO REBANHO

Fêmeas do próprio rebanho podem ser utilizadas como receptoras de embrião. Podem ser usadas novilhas ou vacas

em lactação ou secas. Entretanto, novilhas virgens apresentam a maior fertilidade, sendo a primeira opção de escolha. Vacas apresentam menor fertilidade, maior susceptibilidade a infecções uterinas, além dos efeitos decorrentes do balanço energético negativo caso estejam em lactação. O uso de receptoras do próprio rebanho apresenta como vantagem o menor investimento, mas, como o número de receptoras do próprio rebanho pode ser limitado, pode-se ter menor seleção de receptoras aptas e, conseqüentemente, menor taxa de gestação após a transferência dos embriões.

3.6.2 ADQUIRA AS RECEPTORAS

A compra de animais para serem utilizados como receptoras é outra opção que o produtor tem para implantar um programa de multiplicação de animais superiores. Apesar do maior investimento inicial, é possível uma maior seleção das receptoras, em termos de tamanho e padrão racial. Preferencialmente, utilizam-se novilhas virgens, com peso mínimo de 300 kg e bom desenvolvimento corporal no momento da aquisição. Assim, após a aquisição, há tempo para a realização de exames sanitários e para a vacinação das novilhas, até que comecem a dar cio.

3.6.3 TERCEIRIZE AS RECEPTORAS

A terceira opção de uso de receptoras é a terceirização. Atualmente, existem empresas especializadas no fornecimento de receptoras, geralmente ligadas às empresas que realizam os serviços veterinários de TE ou PIVE. Geralmente, essas empresas se responsabilizam pela transferência dos embriões, pelo diagnóstico de gestação e pela determinação do sexo fetal. O produtor, nesse caso, adquire apenas as receptoras com gestação confirmada, de acordo com os critérios estabelecidos pela empresa.

3.7 ELABORE UM CRONOGRAMA DE TRABALHO

Após a definição dos passos anteriores, é necessário elaborar um cronograma de trabalho junto com o veterinário responsável pela execução das técnicas. A TE e a PIVE envolvem atividades de sincronização: a) de cio de doadoras e receptoras, na transferência de embriões; b) do cio das receptoras com o dia da fecundação *in vitro*, na produção *in vitro*. A programação das atividades, além da necessidade de que os eventos ocorram de forma simultânea, faz com que seja necessária a implementação de um cronograma de trabalho que presuma os prazos para a realização das diferentes atividades.

3.8 ADQUIRA O MATERIAL NECESSÁRIO

Após o estabelecimento do cronograma de trabalho, o passo seguinte é a aquisição do material necessário. O material a ser adquirido é específico para a atividade e envolve material de laboratório, hormônios e sêmen, conforme solicitado pelo médico veterinário.

3.9 IMPLEMENTE PROTOCOLOS HORMONAIIS NAS DOADORAS E RECEPTORAS

O início das atividades do programa em si começa com a implementação de protocolos hormonais para a sincronização de receptoras. Na transferência de embriões, é necessária a implementação de protocolos hormonais para a sincronização do cio e superovulação das doadoras. Na produção *in vitro* de embriões, pode ser realizada ou não a sincronização das doadoras antes da aspiração folicular. Tanto na TE quanto na PIVE, é necessário realizar a sincronização do cio das receptoras, para que seja concomitante com o cio das doadoras na TE e com o dia da fecundação *in vitro*, no caso da PIVE. De acordo com a disponibilidade e custos, podem ser adotados protocolos hormonais à base de análogos da prostaglandina ou de progestágenos, de acordo com recomendação do médico veterinário.

Na TE, os protocolos hormonais das doadoras consistem na sincronização inicial do cio, denominado de cio base, com aplicação de análogos da prostaglandina. Alternativamente, esse cio base pode ser dispensado pela adoção de protocolos hormonais baseados em progestágenos. Após essa sincronização inicial, procede-se à superestimulação para múltipla ovulação, conhecida como superovulação, à base de hormônio folículo-estimulante (FSH), de acordo com o protocolo e a dose recomendados pelo médico veterinário.

3.10 OBTENHA OS EMBRIÕES

Após a adoção de protocolos hormonais para a sincronização de doadoras e receptoras, a próxima etapa do programa é a obtenção dos embriões, por TE ou por PIVE.

3.10.1 OBTENHA OS EMBRIÕES POR TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

Antes de obter os embriões por TE, conheça mais sobre a técnica, suas vantagens e limitações e seus procedimentos.

a) Conheça o histórico da TE

A possibilidade de coletar e transferir embriões em mamíferos foi demonstrada no final do século 19; entretanto, a aplicação comercial desta técnica só foi possível após o desenvolvimento dos protocolos hormonais de superovulação e, principalmente, das técnicas de coleta e transferência sem a necessidade de cirurgia. A TE foi à primeira tecnologia de embriões com aplicação comercial expressiva em todo o mundo.

No Brasil, a transferência de embriões começou a ser empregada na década de 70, e foi gradualmente ganhando expressão nas décadas seguintes. As vantagens da técnica como ferramenta de multiplicação de animais de alto valor foi rapidamente reconhecida pelo setor produtivo, e um número crescente de criadores passou a adotá-la, resultando em significativa expansão no uso da TE a partir da década de 90. Hoje, o Brasil é um dos países que, no mundo, mais empregam a transferência de embriões em bovinos.

Contribuíram para o crescimento da transferência de embriões o aumento no número de veterinários qualificados para realizar a técnica e a disponibilidade de meios, hormônios e materiais descartáveis fabricados por empresas nacionais, o que reduziu o custo e simplificou os procedimentos, diminuindo a dependência de laboratórios com infraestrutura física e equipamentos sofisticados. Existem hoje diversos veterinários prestando este serviço a campo, assim como empresas conhecidas como Centrais de Transferência, que podem oferecer os serviços de hospedagem das doadoras e fornecimento de receptoras.

b) Conheça as vantagens e aplicações da TE

Na reprodução natural, uma vaca pode produzir, no máximo, uma cria por ano; em média, isso significa oito a dez crias em toda a vida reprodutiva. Pelo uso da transferência de embriões, uma doadora pode produzir essa quantidade em apenas um ano. Desta forma, fêmeas de alto valor genético podem ser utilizadas de forma intensiva para promover o melhoramento genético dos rebanhos, assim como é feito com os touros. A principal diferença é que, neste caso, pela inseminação, o progresso genético envolve todos os animais do rebanho, e o ganho ocorre a cada geração. Pelo uso da TE, o processo de melhoramento ocorre por substituição, com as fêmeas de menor valor sendo usadas como receptoras e apenas gestando os embriões dos melhores animais, as doadoras. O progresso genético, neste caso, é bem mais rápido.

A transferência de embriões abriu novas perspectivas para os programas de seleção e de melhoramento genético, antes limitados ao uso da IA. Na espécie bovina, programas de seleção genética baseados na transferência de embriões, conhecidos como Núcleos MOET (Múltiplas Ovulações e Transferência de Embriões), têm sido implantados concomitantemente ao esquema de teste de progênie, otimizando o processo de melhoramento. Hoje, praticamente, todos os grandes criatórios de animais de elite usam a transferência de embriões rotineiramente.

A TE também apresenta outras vantagens e potenciais. A técnica vem sendo utilizada, por exemplo, na conservação e multiplicação de animais ou raças ameaçadas de extinção; também é fundamental na redução do risco de transmissão de doenças no comércio internacional de material genético bovino, sendo a forma mais segura de se introduzir novas raças em uma região. A TE pode até ser utilizada como uma alternativa de manejo para reduzir os efeitos negativos do calor em rebanhos puros de raças europeias, pela coleta nas épocas mais frias, congelamento dos embriões e transferência nas épocas mais quentes.

c) Conheça as limitações da TE

A transferência de embriões deve ser vista como uma ferramenta para o alcance de determinadas metas, e não como um objetivo por si só. O que garante o sucesso de uma propriedade não é o uso de uma determinada tecnologia, mas

como ela é empregada, e a TE não é exceção. Do ponto de vista econômico, por exemplo, o sucesso da TE é computado considerando-se a relação entre o custo da execução da técnica e o retorno obtido com os animais nascidos. Uma propriedade que implemente um programa e produza muitos embriões e gestações, mas que não consiga colocar os produtos nascidos no mercado, está fadada ao fracasso. Por isso, as primeiras questões a serem colocadas são: Quanto custa produzir um animal por TE? Qual o seu valor de mercado?

Em relação à técnica propriamente dita, a TE ainda apresenta algumas limitações importantes e que devem ser consideradas antes de se implementar um programa; a principal delas é que a resposta aos tratamentos hormonais é imprevisível, e nem todos os animais respondem adequadamente e produzem embriões viáveis, mesmo apresentando bom histórico reprodutivo. Apesar de a média mundial ser de 5 a 6 embriões viáveis por coleta, existem animais que produzem mais de 30 ou 40 embriões viáveis por coleta, assim como animais que nunca produzirão embriões. Como complicante adicional, não existe uma forma confiável de se estimar com antecedência se uma determinada doadora irá ou não responder.

Essa restrição tem um impacto direto no custo do processo, uma vez que, para cada doadora superovulada, é necessário preparar com antecedência um certo número de receptoras. Como isto é imprevisível, é muito difícil adequar o número de receptoras ao de embriões disponíveis, e tanto a falta como o excesso de receptoras significam perdas econômicas. O congelamento seria uma alternativa, mas só pode ser usado em embriões de melhor qualidade, e a taxa de gestação obtida com embriões congelados é sempre menor que a obtida mediante transferência direta. Uma estratégia para minimizar esta dificuldade é trabalhar com mais de uma doadora em cada procedimento, buscando equilibrar os resultados de boas e más doadoras. Em determinadas raças, a inconstância dos resultados da TE tem levado os criadores a optarem por outras tecnologias de embriões, como a fertilização *in vitro*.

Outra importante limitação da transferência de embriões está relacionada ao nível tecnológico e de manejo da propriedade. As etapas de superovulação, formação dos embriões e gestação após a transferência são muito sensíveis a fontes de variação externas, particularmente relacionadas à nutrição e sanidade tanto de doadoras como de receptoras. Da mesma forma, a execução dos procedimentos necessários requer mão de obra qualificada e motivada e com um mínimo de experiência em manejo reprodutivo, particularmente quanto à observação deaios e inseminação. A complexidade do processo também requer um bom registro zootécnico e coordenação de informações entre as pessoas envolvidas. Dessa forma, é altamente recomendável que um programa de TE seja implementado apenas se associado a outro de assistência técnica e manejo reprodutivo e conduzido considerando-se outros indicadores de eficiência do rebanho.

Por fim, é importante lembrar que a transferência de embriões é uma ferramenta que possibilita multiplicar o

número de descendentes de um determinado animal, seja ele de valor ou não. Dessa forma, se for orientada adequadamente e utilizada em animais geneticamente inferiores, pode ocorrer retrocesso genético, na mesma velocidade em que poderia haver progresso. Erros na orientação de um programa de TE podem ter consequências graves para a estrutura de um rebanho a médio e longo prazos. E é importante lembrar que a caracterização do potencial genético de um animal requer uma avaliação técnica, pois nem sempre um animal que tenha uma característica de interesse irá transmitir esta característica aos seus descendentes, particularmente em animais mestiços.

d) Conheça a TE passo a passo

A TE é uma biotécnica que envolve as seguintes etapas durante sua execução.

■ Reúna o material

- agulha;
- álcool 70%;
- anestésico;
- circuito em Y para colheita de embriões;
- estante para tubos;
- filtro de colheita de embriões;
- lupa;
- luvas de palpação retal;
- luvas de procedimento;
- mandril;
- papel-toalha;
- placa aquecedora;
- placas de Petri;
- pinça hemostática;
- pipetadores;
- seringa;
- solução (meio) para colheita de embriões;
- sonda de Foley;
- tubos tipo Falcon de 50 mL.



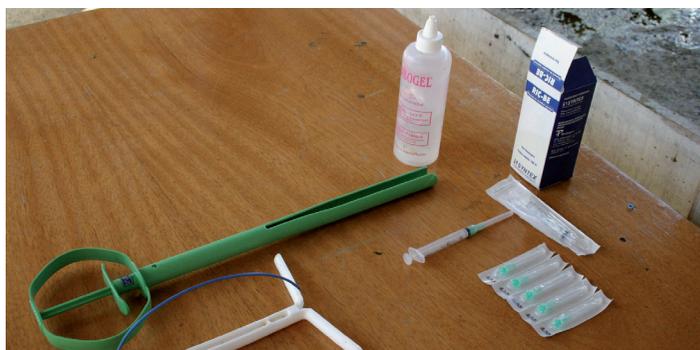
■ Faça a seleção de doadoras

A TE baseia-se na seleção de doadoras, que podem ser vacas ou novilhas que estejam dando cio regularmente e de acordo com seu histórico reprodutivo.



■ Estabeleça os protocolos hormonais

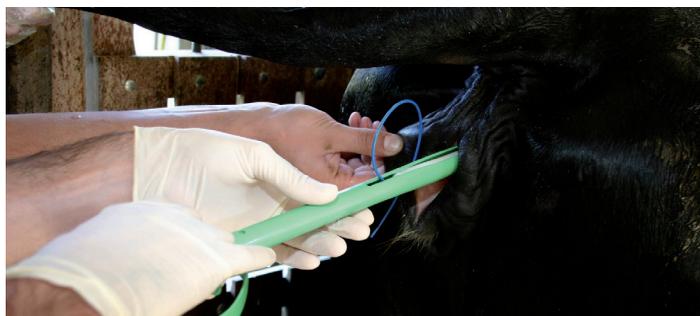
As fêmeas selecionadas são submetidas a protocolos hormonais para induzir a superovulação, ou seja, a ocorrência de múltiplas ovulações ao mesmo tempo. Podem ser utilizados diferentes hormônios e doses, de acordo com a recomendação do veterinário responsável pelas atividades. Uma característica importante desse tratamento hormonal é que devem ser mantidos intervalos de 12 horas entre as aplicações dos hormônios da superovulação. Diferenças nesse intervalo comprometem o processo, fazendo com que a vaca não responda ao tratamento hormonal.



Material para tratamento hormonal



Preparação do aplicador de hormônios



Aplicação de hormônios

■ Faça a inseminação artificial

Após o tratamento hormonal, as fêmeas entram em cio, que é semelhante a um cio normal. Contudo, como vários folículos se desenvolveram, apenas uma inseminação geralmente



não é suficiente para garantir que todos os oócitos sejam fecundados. Assim, estabelecem-se diferentes protocolos de inseminação, em que são realizadas duas ou três inseminações, em diferentes intervalos, de acordo com a recomendação do veterinário responsável.

■ Colha os embriões

A colheita dos embriões ocorre sete dias após a inseminação artificial; ela é realizada mediante lavagem uterina, utilizando-se um circuito de colheita de embriões. Esse circuito de colheita utiliza um meio de lavagem, geralmente uma solução salina tamponada fosfatada (PBS), que é infundido no útero da vaca com o auxílio de uma sonda de Foley. Essa sonda possui um balão que pode ser inflado com ar, o que permite sua fixação no útero e impede que o meio de lavagem retorne para fora do útero. Ela é acoplada a um tubo em Y, em que uma parte é ligada ao meio de lavagem e outra a um filtro de coleta de embriões. O filtro é composto de uma fina malha de náilon, que retém os embriões. Além disso, esse tubo em Y é equipado com manoplas que permitem controlar o fluxo de entrada e de saída do meio de lavagem do útero.



Coleta de embriões

■ **Selecione os embriões, classificando-os**

Após a lavagem, o veterinário verte o conteúdo residual do filtro em uma placa de Petri e, com o auxílio de uma lupa (estereomicroscópio) procura os embriões lavados. Os embriões recuperados são selecionados e classificados pelo veterinário responsável em viáveis ou inviáveis, conforme seu estágio de desenvolvimento e sua qualidade, de acordo com critérios internacionais. Esse procedimento classifica os embriões recuperados quando eles são selecionados para a transferência (ou inovulação) ou para o congelamento, caso haja sobra de embriões. Devido a uma produção acima da esperada, ou uma baixa taxa de sincronização das receptoras, os embriões produzidos podem ser preservados por congelamento ou outro método de criopreservação, como a vitrificação. Atualmente, são obtidas taxas de gestação satisfatórias após o congelamento de embriões produzidos *in vivo* (TE).

3.10.2 OBTENHA OS EMBRIÕES POR PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO*

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) ou fecundação *in vitro* (FIV) é outro método utilizado para a obtenção de embriões, que envolve oócitos recuperados de doadoras. Apesar de uma fêmea bovina possuir capacidade de gerar somente um filho por ano, o seu ovário possui, ao nascimento, em torno de 70.000 oócitos, que poderão ser utilizados para a produção de bezerros. O aproveitamento desses oócitos aumenta a capacidade de uma fêmea de alto valor produtivo em gerar descendentes de também alto valor produtivo. A PIVE permite uma maior eficiência na produção de embriões de uma mesma fêmea, quando comparada com a TE, podendo proporcionar mais de uma centena de filhos na vida reprodutiva de uma vaca.

a) Conheça o histórico da PIVE

O primeiro nascimento de um bezerro com a utilização da fecundação *in vitro* foi relatado em 1982, porém somente em 1987 é que nasceram bezerros oriundos de embriões totalmente produzidos *in vitro*. Antes disso, os embriões eram cultivados em oviduto de ovelhas ou de coelhas, de onde eram recuperados após seis a sete dias e transferidos para as receptoras. No Brasil, as pesquisas com a PIVE começaram em 1990, sendo as primeiras gestações confirmadas em 1993; em 1994, nasceram os primeiros bezerros, da raça Nelore, a partir de embriões produzidos *in vitro*.

O avanço do conhecimento sobre as necessidades de oócitos e embriões durante o cultivo *in vitro* e o desenvolvimento de aparelhos ultrassonográficos apropriados para a obtenção de oócitos em bovinos permitiu que a PIVE passasse da pesquisa para o campo nessa espécie. Atualmente, no Brasil, a PIVE é a principal técnica utilizada para a produção de embriões, com 195.920 embriões transferidos para receptoras em 2007 contra 41.420 embriões produzidos por TE. Esta elevada produção de embriões pela PIVE coloca o Brasil como o principal país a fazer uso dessa técnica massivamente, tornando-o referência mundial em tecnologia reprodutiva.

b) Conheça as vantagens e aplicações da PIVE

A principal vantagem da PIVE é seu poder de gerar um grande número de bezerros de uma mesma fêmea. Enquanto na TE pode-se obter, em média, de oito a dez crias por ano, na PIVE esse valor é multiplicado, podendo chegar a centenas. Com esse potencial de multiplicação, a PIVE permite que fêmeas de elevado valor produtivo tenham inúmeras filhas que, espera-se, sejam melhores do que as mães, aumentando o ganho genético. Contudo, a técnica deve ser usada com critério, evitando-se que animais com características indesejáveis também sejam multiplicados.

Entre as vantagens práticas associadas à PIVE, destacam-se:

1) possibilidade de fazer acasalamentos de uma fêmea com vários touros, permitindo várias combinações touros e vacas, de acordo com a necessidade do rebanho;

2) economia no uso da dose de sêmen congelado, quando uma palheta de sêmen que seria usada para a inseminação de um animal pode ser usada em oócitos de várias fêmeas, principalmente em se tratando de sêmen muito caro;

3) uso mais eficiente do sêmen sexado do que as outras técnicas disponíveis, porque possibilita o direcionamento para a produção de bezerros do sexo desejado, de acordo com a atividade pecuária – leite ou carne;

4) uso em animais de alto valor produtivo que não mais seriam usados na TE por não responderem à superovulação ou com problemas de fertilidade adquiridos, como alterações no oviduto, útero ou cérvix;

5) a possibilidade de se aplicar a PIVE em bezerras impúberes, que não apresentam uma boa resposta à TE convencional. Na PIVE seus oócitos podem ser aspirados, fecundados e cultivados *in vitro* sem grandes dificuldades. Isso permitiria que fêmeas de um ano de idade tivessem filhos ou filhas nascidas de receptoras, o que reduziria o intervalo entre gerações e aumentaria o ganho genético.

c) Conheça as limitações da PIVE

A exemplo de qualquer tecnologia, a PIVE também possui suas limitações. Como várias etapas são realizadas *in vitro*, a técnica requer a instalação de um laboratório bem estruturado e equipado, procedimentos exigentes de higiene, para evitar contaminações, e equipe técnica especializada. Essas exigências requerem elevado investimento inicial, mas que pode ser compensado por uma elevada produção de embriões. Atualmente, existem dezenas de laboratórios comerciais que podem produzir os embriões de acordo com a demanda da fazenda. Pelo lado do produtor, a PIVE exige um bom nível de manejo na fazenda, com mão de obra qualificada e manejo reprodutivo eficiente de doadoras e receptoras, para que se possa maximizar a produção de embriões, obter uma boa taxa de gestação e, assim, apresentar um retorno rentável. A técnica deve ser aplicada visando melhorar geneticamente um plantel de uma fazenda, e sua relação custo/benefício deve ser estudada caso a caso.

Existem também as limitações técnicas. A principal delas é a menor congelabilidade dos embriões produzidos *in vitro* associada à falta de um procedimento padrão que permita que eles sejam congelados e estocados em nitrogênio líquido, tal como ocorre com o sêmen. Esta deficiência limita o uso de embriões para se evitar uma baixa taxa de gestação. Como exemplo dessa dificuldade, somente 4% dos embriões produzidos *in vitro* em 2007 no Brasil foram transferidos para receptoras após a congelação. A falta da congelação nos embriões PIVE impede que eles sejam conservados por longos períodos e transportados por longas distâncias, o que também limita sua comercialização. Com isso, muitos rebanhos têm se especializado em formar animais receptores para receber embriões a fresco, possibilitando, assim, a comercialização dos embriões PIVE na barriga das receptoras. Espera-se que, em breve, com a melhora nos procedimentos de cultivo *in vitro* e com o estabelecimento de uma técnica de congelação apropriada, principalmente ao gado zebuino, a congelação de embriões PIVE se torne amplamente utilizada.

Dois outros problemas podem surgir com a PIVE:

- 1) maior incidência de bezerros nascendo com peso acima da média;
- 2) mais bezerros machos.

Aparentemente, essas alterações podem surgir devido ao cultivo *in vitro* dos embriões, entretanto, com o avanço das pesquisas, elas têm diminuído. Por outro lado, a disponibilidade de sêmen sexado para fêmea para a PIVE tem também evitado a maior incidência de nascimento de bezerros machos.

d) Conheça a PIVE passo a passo

A PIVE envolve algumas etapas semelhantes à TE, como a seleção de doadoras e o estabelecimento de protocolos hormonais em receptoras, entretanto, possui etapas diferentes, como a aspiração folicular para a recuperação de oócitos, feita na própria fazenda, além da parte laboratorial da produção *in vitro* dos embriões em si.

■ Faça a seleção de doadoras

A seleção de doadoras para a PIVE baseia-se nos mesmos critérios utilizados para a TE; entretanto, a PIVE pode ser aplicada em animais que não são aptos à TE, como novilhas impúberes e vacas no terço inicial de gestação. Além disso, vacas com problemas de fertilidade adquiridos, que impeçam o desenvolvimento normal de uma gestação, e vacas que não respondem aos protocolos hormonais para a superovulação na transferência de embriões são candidatas a doadoras de oócitos na PIVE.



■ Implemente protocolos hormonais para a sincronização de receptoras

Na TE são feitos protocolos hormonais em doadoras e receptoras; já na PIVE, eles são necessários apenas nas receptoras. Os protocolos a serem implementados deverão seguir a orientação do médico veterinário responsável pela condução do processo.



■ Reúna o material para realizar a aspiração folicular guiada por ultrassonografia

Nos ovários das vacas, os oócitos estão localizados em estruturas denominadas folículos. Para a sua recuperação, utiliza-se a técnica de aspiração folicular guiada por ultrassonografia. Nesse sistema, o veterinário utiliza um aparelho de ultrassonografia para visualizar os folículos ovarianos, que são puncionados utilizando-se um dispositivo (guia de punção) acoplado a uma agulha, a um circuito de coleta e a uma bomba de vácuo, que gera uma pressão negativa no sistema para aspirar o conteúdo dos folículos.

Eis a lista do material necessário:

- agulha;
- agulha descartável para punção folicular;
- anestésico;
- aparelho de ultrassonografia;
- bomba de vácuo;
- circuito de aspiração folicular;
- gel de ultrassonografia;
- luvas de palpação retal;
- luvas de procedimento;
- seringa;
- transdutor vaginal acoplado à guia de punção;
- tubo tipo Falcon.



■ **Faça a aspiração folicular guiada por ultrassonografia**

Enquanto com uma das mãos o veterinário manipula o ovário via retal, com a outra manipula a sonda com guia de punção e agulha colocada no fundo da vagina e acoplada ao aparelho de ultrassom, onde se visualiza a imagem do ovário com os folículos. Com ajuda de uma bomba de vácuo, o líquido do folículo contendo o oócito é aspirado para um tubo aquecido, que, então, segue para o laboratório.

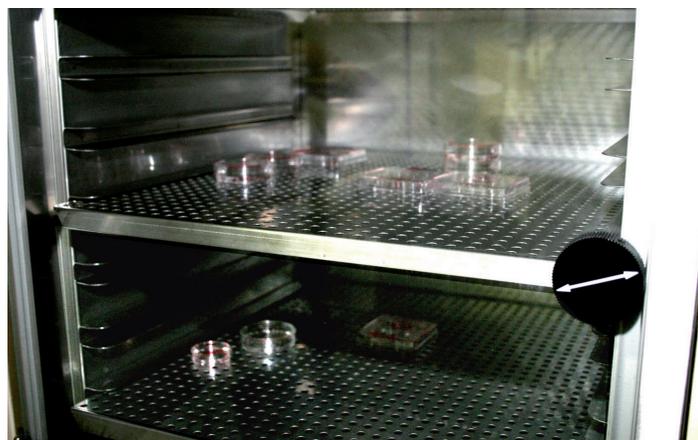


■ **Faça a maturação *in vitro* dos oócitos**

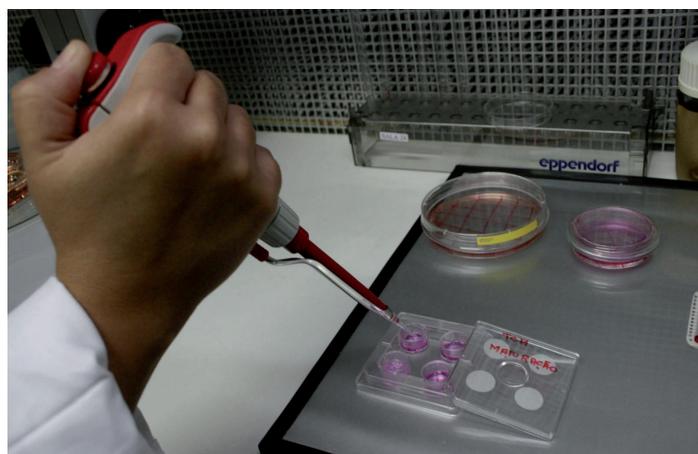
No laboratório, o oócito recém-coletado é cultivado por 24 horas em líquido enriquecido com nutrientes, chamado meio de cultivo, colocado em placas ou tubos dentro de uma incubadora com condições atmosféricas ideais, para que se torne maturado e pronto para ser fecundado.



Oócitos em meio de cultura



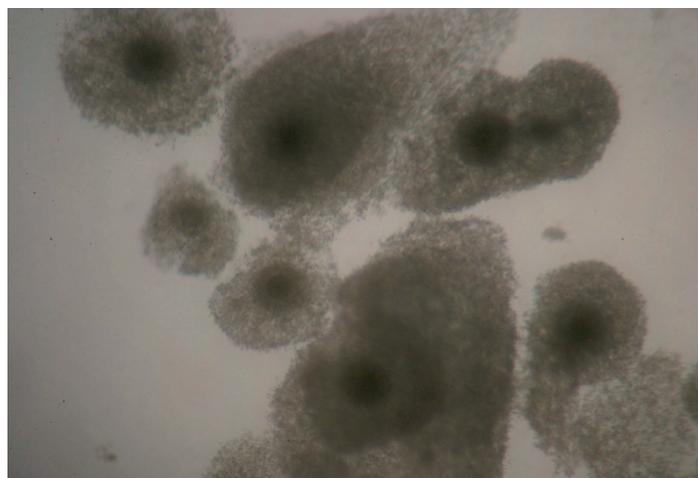
Oócitos maturando em incubadora



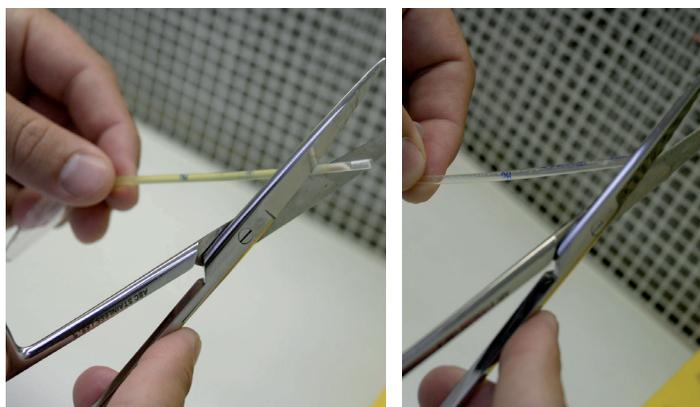
Oócito pronto para ser fecundado

■ **Faça a fecundação *in vitro* dos oócitos**

A fecundação ocorre com sêmen bovino preparado previamente e misturado com os oócitos já maturados, seguindo uma proporção espermatozoides-oócitos adequada. O período de cultivo para a fecundação pode durar de 12 a 24 horas dentro de incubadoras, também em meio de cultivo apropriado para manter a viabilidade e vigor dos espermatozoides por mais tempo, garantindo uma melhor taxa de fecundação dos oócitos.



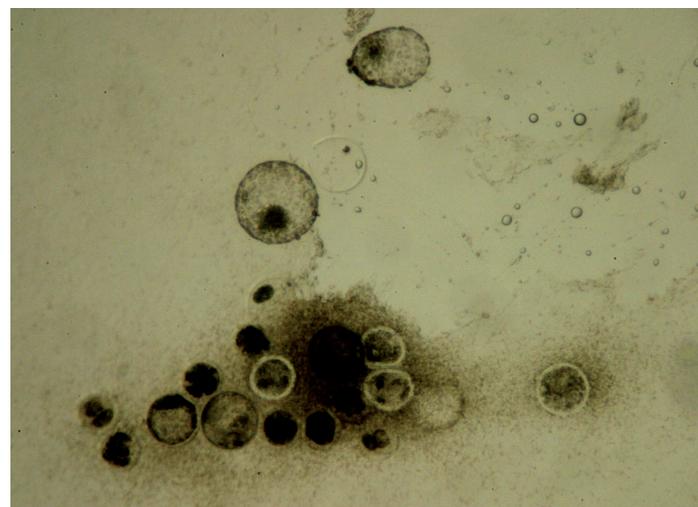
*Oócitos maturados *in vitro* em gotas de fecundação*



Preparação do sêmen

■ Faça o cultivo *in vitro* dos possíveis zigotos

Após o período de fecundação, os óocitos que darão origem aos embriões são removidos do líquido de fecundação e transferidos para outro meio, mas agora de cultivo embrionário. Esse cultivo embrionário é feito por sete ou oito dias em placas ou tubos dentro de uma incubadora com condições atmosféricas ideais, onde, então, atingem os estádios de blastócistos, quando são transferidos para as receptoras.



3.11 PROCEDA À SELEÇÃO, CLASSIFICAÇÃO, INOVULAÇÃO OU CONGELAMENTO DE EMBRIÕES

Após a obtenção dos embriões, procede-se à sua seleção e classificação. Os embriões são classificados como viáveis ou inviáveis. Aqueles embriões classificados como viáveis podem ser transferidos para receptoras sincronizadas. Na sincronização, deve-se observar que a data do cio da receptora seja a mesma do cio da doadora, no caso da TE, ou da fecundação *in vitro*, no caso da PIVE, podendo ser utilizadas receptoras que deram cio até um dia antes ou depois, ou de acordo com a recomendação do médico veterinário responsável.

Caso haja sobra de embriões, devido a uma produção acima da esperada, ou uma baixa taxa de sincronização das receptoras, os embriões produzidos podem ser preservados

por congelamento ou outro método de criopreservação, como a vitrificação. Atualmente, são obtidas taxas de gestação satisfatórias após o congelamento de embriões produzidos *in vivo* (TE). Por outro lado, embriões produzidos *in vitro* (PIVE) são muito sensíveis à criopreservação, não havendo, até o presente momento, método que resulte em taxas aceitáveis de prenhez.



Para a implantação na vaca dos embriões PIVE, preenche-se uma palheta de 0,25 mL, semelhante à utilizada para sêmen, com solução própria contendo o embrião. Essa palheta é montada em um inovulador, que é parecido com o aplicador de sêmen, porém de menor diâmetro e maior comprimento, revestido por uma bainha de transferência de embriões. Além da bainha, utiliza-se uma camisa sanitária, que é uma camisa plástica que envolve a bainha, para evitar a sua contaminação.



Os embriões são inovulados no útero das receptoras. Ao contrário da inseminação, em que se deposita o sêmen no corpo uterino, na inovulação o embrião é depositado na ponta do corno uterino, por médico veterinário treinado. Além disso, o médico veterinário deve identificar a presença de corpo lúteo no ovário direito ou esquerdo e colocar o embrião do lado em que se encontra o ovário com corpo lúteo. Durante o processo, promove-se o rompimento da

camisa sanitária após a passagem do primeiro ou segundo anéis cervicais, puxando-a para trás. Dessa forma, garante-se que o inovulador não tenha sido contaminado e possa ser introduzido até o corpo do útero da vaca sem o risco de provocar infecção uterina.



3.12 COMUNIQUE OS PROCEDIMENTOS REALIZADOS À ASSOCIAÇÃO DE CRIADORES

Após a transferência ou congelamento dos embriões, é necessário comunicar à associação de criadores sobre todos os procedimentos realizados, informando os detalhes de cada doadora, do sêmen do touro utilizado para inseminação ou fecundação *in vitro*, dos embriões produzidos e se foram inovulados ou congelados. Cada associação de raça possui normas próprias que devem ser consultadas previamente e, dentro do prazo estipulado, o médico veterinário responsável deve informar sobre as atividades realizadas.

3.13 REALIZE O DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO E DO SEXO FETAL

De acordo com a programação do médico veterinário, devem ser realizados diagnósticos de gestação aos 30 e aos 60 dias, considerando-se como referência a data do cio da doadora ou da fecundação *in vitro*. Ainda, por questões comerciais, é importante determinar o diagnóstico de sexo fetal, por ultrassonografia. Preferencialmente, a determinação do sexo fetal deve ser realizada aos 65 dias após o cio ou após a fecundação *in vitro*.



Ultrassom

3.14 MONITORE AS GESTAÇÕES E OS PARTOS

Após o diagnóstico de gestação, deve-se monitorar as gestações, para evitar possíveis abortos. Além disso, as receptoras devem ser acompanhadas ao parto, devido ao risco da ocorrência de partos difíceis, para evitar a perda dos bezerros produzidos com elevado custo.



3.15 AVALIE OS RESULTADOS

A avaliação dos resultados é etapa importante de um programa de multiplicação de fêmeas geneticamente superiores. Os resultados devem ser avaliados quanto ao número de embriões produzidos, resposta da doadora, eficiência da sincronização de receptoras e taxa de prenhez. Entretanto, as avaliações devem estender-se até o parto, para, efetivamente, serem contabilizados os produtos nascidos e o resultado dos acasalamentos realizados nas doadoras.

Como são técnicas de custo elevado, os resultados devem ser acompanhados de perto, a cada etapa. Assim, garante-se um maior número de produtos obtidos, com um acasalamento correto que, efetivamente, promova o melhoramento genético do rebanho, e a produção de animais superiores para comercialização.