



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**INFLUÊNCIA DO BEM-ESTAR ANIMAL NA REPRODUÇÃO DE  
BOVINOS**

**Ana Paula Saraiva Soares**

**Orientador: Dr. Ivo Pivato**

BRASÍLIA - DF

Maio/2021



**ANA PAULA SARAIVA SOARES**

**INFLUÊNCIA DO BEM-ESTAR ANIMAL NA REPRODUÇÃO DE  
BOVINOS**

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

**Orientador:** Dr. Ivo Pivato

BRASÍLIA - DF

Maio/2021

SS676i Saraiva Soares, Ana Paula  
Influência do bem-estar animal na reprodução de bovinos /  
Ana Paula Saraiva Soares; orientador Ivo Pivato. --  
Brasília, 2021.  
59 p.

Monografia (Graduação - Medicina Veterinária) --  
Universidade de Brasília, 2021.

1. Bem-estar animal. 2. Reprodução. 3. Bovinos. 4.  
Liberdades. 5. PIVE. I. Pivato, Ivo , orient. II. Título.

## Cessão de Direitos

Nome do Autor: Ana Paula Saraiva Soares

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Influência do bem-estar animal na  
reprodução de bovinos

Ano: 2021

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.

---

Ana Paula Saraiva Soares

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Nome do Autor: SOARES, Ana Paula Saraiva

Título: Influência do bem-estar animal na reprodução de bovinos

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 13/05/2021

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ivo Pivato

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: Aprovada.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliana Targino S. A. e Macêdo

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: Aprovada.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: Aprovada.

Assinatura: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Gratifico primeiramente a Deus, por me abençoar e me dar força, coragem e sabedoria para continuar perseguindo meu sonho, tornando-me uma pessoa focada e motivada a superar todos os obstáculos com um sorriso no rosto.

Agradeço minha Mãezinha do céu que me guardou durante toda a produção deste trabalho. Gratifico também a minha outra mãezinha que também está no céu, por me motivar a sempre ser cada vez melhor como pessoa.

Agradeço a meu pai e a meu irmão, por estarem sempre comigo em todas as etapas da minha vida, e à minha família, pelo apoio, carinho e motivação.

Agradeço especialmente às minhas amigas: Ayla, Ádyla, Mariana, Larissa, Laura, Vanessa e Arielli, por serem minhas parceiras de faculdade/profissão e amigas para a vida toda, me apoiando e motivando a ser uma pessoa e profissional cada vez melhor.

Um abraço afetuoso e carinhoso aos meus demais colegas estudantes de veterinária da turma 38 da UnB, por compartilharem seus conhecimentos e experiências.

Agradeço a todos os funcionários da empresa BIO, pelo acolhimento, risadas, carinho, e ensinamentos durante esses 4 meses de estágio.

Por fim, demonstro minha gratidão à UnB e seus excelentes docentes, que me proporcionaram uma formação apropriada e proveitosa.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	8
LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	10
RESUMO .....	11
1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1 Bem-estar animal .....	15
2.2 As cinco liberdades na reprodução bovina .....	18
2.2.1 Fome e sede .....	18
2.2.2 Desconforto .....	20
2.2.3 Medo e ansiedade .....	23
2.2.4 Dor e doenças .....	23
2.2.5 Expressão de seu comportamento natural .....	26
2.2.6 BEA e biotécnicas da reprodução .....	26
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	28
4. PARTE II - Relatório de Estágio .....	29
4.1 Plano de Atividades .....	30
4.2 Análise de sêmen .....	30
4.2.1 Características físicas da dose seminal .....	31
4.2.2 Análise morfológica .....	35
4.2.3 Congelamento de sêmen .....	36
4.3 Laboratório de PIVE .....	37
4.3.1 Maturação de ovócitos .....	38
4.3.2 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV) .....	38
4.3.3 Cultivo <i>in vitro</i> de embriões (CIV) .....	40
4.3.3.1 Envase a fresco .....	43
4.3.3.2 Congelamento de embriões .....	46
4.4 Sistemas MultBovinos .....	47
4.5 Lavagem e Esterilização .....	48

4.5.1 Materiais do laboratório de PIVE.....	48
4.5.2 Materiais de campo .....	50
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O ESTÁGIO OBRIGATÓRIO .....	50
6. REFERÊNCIAS .....	51

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. As cinco liberdades do bem-estar animal .....	16
Tabela 2. Indicadores de grau reduzido e elevado de BEA .....	18
Tabela 3. Características desejáveis para dose de espermatozoides congelados .....	35



**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Fachada da BIO-Biotecnologia em Reprodução Animal.....	30
Figura 2. Trajeto percorrido pelos espermatozoides registrado pelo CASA.....	34
Figura 3. Placa aquecedora e eppendorfs contendo amostras de sêmen incubado para a realização da TTR .....	35
Figura 4. Organização da placa de CIV .....	42
Figura 5. Embriões em estágio de desenvolvimento Bi.....	43
Figura 6. Embriões em estágio de desenvolvimento BI .....	43
Figura 7. Embriões em estágio de desenvolvimento Bx e Bx eclodido .....	43
Figura 8. Organização da bancada auxiliar para o envase de embriões a fresco .....	44
Figura 9. Esquema de preenchimento da palheta de envase a fresco.....	45
Figura 10. Embriões Bx1 na transportadora de embriões.....	46
Figura 11. Esquema de preenchimento da palheta para criopreservação .....	48
Figura 12. Congelamento de embriões .....	49
Figura 13. Etapas da esterilização dos lacres para envase a fresco .....	50

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AGNE .....	Ácido graxo não esterificado
BEA .....	Bem-estar animal
BEN .....	Balanço energético negativo
Bi .....	Blastocisto inicial
Bl .....	Blastocisto
BoHV-1 .....	Herpesvírus bovino tipo-1
BVD .....	Diarreia viral bovina
Bx .....	Blastocisto expandido
CASA .....	Computer-Assisted Sperm Analysis
CIV .....	Cultivo <i>in vitro</i> de embriões
DIC .....	Microscopia de contraste de interferência diferencial
ECC .....	Escore da condição corporal
FIV .....	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH .....	Hormônio folículo estimulante
HSP .....	Proteínas de choque térmico
IA .....	Inseminação artificial
IATF .....	Inseminação artificial em tempo fixo
IBR .....	Rinotraqueíte infecciosa bovina
IETS .....	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
LH .....	Hormônio luteinizante
MIV .....	Maturação <i>in vitro</i>
MO .....	Mórula
PI .....	Permanentemente infectado
PIVE .....	Produção <i>in vitro</i> de embriões
RGD .....	Número de registro
SFB .....	Soro fetal bovino
SNP .....	Sistema nervoso simpático
SNS .....	Sistema nervoso parassimpático
TE .....	Transferência de embriões

TTR ..... Termo-resistência

**Influência do bem-estar animal na reprodução de bovinos*****Animal welfare influence in bovine reproduction***

Ana Paula Saraiva Soares

**RESUMO:**

O bem-estar animal é um dos tópicos de maior discussão na atualidade e leva em consideração as necessidades biológicas, nutricionais, sanitárias e ambientais dos animais, as quais foram divididas em cinco liberdades. Pelo fato do animal possuir uma hierarquia para a manutenção da vida, viu-se a importância de se atender a esses quesitos essenciais para que o bovino possa desempenhar seu papel reprodutivo de forma ótima. Portanto, objetivou-se demonstrar a influência de cada liberdade do bem-estar sobre a reprodução dos bovinos.

**Palavras chave:** desempenho reprodutivo; liberdades; ruminante.

### **ABSTRACT**

Animal welfare is one of the biggest topics of discussion nowadays and it considers the animal's biological, nutritional, health and environmental needs, which have been divided into five freedoms. Because the animal has a hierarchy for the maintenance of life, it was seen the importance of complying with these essential requirements so that the bovine can play its reproductive role in an optimal way. Therefore, the purpose of this review is to demonstrate the influence of each welfare freedom on bovine reproduction.

**Keywords:** freedoms; reproductive role; ruminant.

## 1. INTRODUÇÃO

O bem-estar animal (BEA) é um dos tópicos em maior discussão na atualidade, tendo em vista o desenvolvimento dos sistemas de criação, melhoramento zootécnico e demanda pela otimização da produção, associados à qualidade de vida dos animais.

Leva em consideração a forma com que as necessidades do animal são atendidas, ou seja, se suas necessidades biológicas não são satisfeitas, há efeitos negativos na fisiologia e comportamento do animal. Este requisito biológico possui uma hierarquia, a qual, exemplificando da mais importante para a de menor importância, tem-se: manutenção da vida, da saúde, dos aspectos reprodutivos e do conforto. As necessidades mais importantes como a manutenção da vida e da saúde são fundamentais e, quando o animal está em pobre condição de bem-estar, são priorizadas em relação às outras. Por este motivo, vislumbrou-se a importância do bem-estar na reprodução, já que se o animal não é capaz de se manter com saúde, deixará a manutenção das funções reprodutivas em segundo plano, não atendendo à perspectiva de produção do produtor.

Dentro do cenário da pecuária brasileira atual, está a busca pelo melhoramento genético dos animais de produção visando aumentar o desempenho produtivo. Para se alcançar tal objetivo, várias biotécnicas reprodutivas estão sendo cada vez mais utilizadas, como a inseminação artificial (IA) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE). Entretanto, não é apenas a biotecnologia adotada que vai determinar o sucesso do produtor em melhorar geneticamente seu rebanho, pois como já exposto, as circunstâncias em que os animais se encontram com relação ao bem-estar também colaboram.

Dessa forma, um bom manejo de criação dos bovinos interfere diretamente na qualidade produtiva e reprodutiva deles, sendo que para condição de conforto dos animais, deve-se atender as necessidades nutricionais, sanitárias e ambientais. Logo, quando os reprodutores envolvidos estão em uma situação de conforto e bem-estar, os parâmetros de qualidade de sêmen e ovócitos e o consequente sucesso nos manejos de inseminação e transferência de embriões

são elevados.

Diante das considerações acima, este trabalho tem o objetivo de fazer uma revisão de literatura sobre os aspectos de bem-estar animal e seus efeitos sobre a reprodução de bovinos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Bem-estar animal (BEA)

A discussão sobre o BEA teve início após a publicação do livro *Animal Machines* de Ruth Harrison, em 1964, o qual denunciava a forma com que os animais envolvidos na produção industrial eram tratados. Com isso, em 1965 na Inglaterra, foi instituído o Comitê Brambell, o qual visava a qualidade de vida e bem-estar de animais criados. Foi nesse Comitê que se iniciou a definição das Cinco Liberdades do Bem-estar Animal, as quais compreendem as necessidades biológicas dos animais para se ter qualidade de vida, são elas: 1. livre de fome e sede; 2. livre de desconforto; 3. livre de medo e ansiedade; 4. livre de dor, lesões e doenças; e 5. livre para expressar seu comportamento natural (Machado Filho et al., 2015), conforme ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1 - As cinco liberdades do bem-estar animal

Liberdades	Descrição
1. Livre de fome e sede	Ser capaz de se alimentar conforme suas necessidades e ter acesso irrestrito à água de boa qualidade.
2. Livre de desconforto	Estar em um ambiente confortável, com acesso à cobertura, e termicamente adequado.
3. Livre de medo e ansiedade	Estar livre de sofrimento mental, protegido de predadores e ter interações positivas com o ser humano.
4. Livre de dor, lesões e doenças	Estar com integridade física, ter acesso a manejo de prevenção de doenças e, se enfermo, ao tratamento.
5. Livre para expressar seu comportamento natural	Estar na companhia de animais da mesma espécie, com interações positivas, em um ambiente adequado e confortável.

Fonte: Adaptado de Queiroz, 2018.

O bem-estar animal tem como princípio a relação entre 3 definições: estado físico (condição), estado mental (sentimentos) e comportamento natural (naturalidade). Tais definições estão interrelacionadas, sendo uma capaz de modificar a outra, ou seja, sempre que há alteração em alguma condição física e/ou mental, modifica-se associadamente o comportamento do animal.

Em relação à condição de estado físico, o bem-estar é definido como o estado do animal no seu esforço em se adaptar ao ambiente em que vive (Broom, 1986), sendo que é considerada uma circunstância inadequada de bem-estar quando há mudança na fisiologia, comprometendo sua sobrevivência, produção e reprodução. As condições físicas não necessariamente são suficientes para que se determine que um animal está em boas condições de bem-estar, ou seja, também depende do que os animais sentem, sendo que a expressão de seu comportamento está diretamente associada a este parâmetro (Broom & Molento, 2004), isto é, se o animal está expressando naturalidade, significa que está em condição de conforto, tanto físico quanto mental.

O BEA também tem seu conceito abordado por 3 áreas de grande importância: ciência, ética e Lei. Na ciência, o bem-estar é um atributo estimável que considera os efeitos do ser humano sobre o animal na perspectiva do próprio animal, buscando mensurar os efeitos fisiológicos, comportamentais, sanitários e psicológicos, avaliando e comparando o comportamento normal com o anormal, isto é, patológico e/ou estereotipado. Na ética, o bem-estar considera as atitudes humanas sobre os animais sob o ponto de vista da moral do comportamento humano, preocupando-se com suas ações na forma com que trata o animal. A Lei, por sua vez, envolve o aspecto jurídico sobre a normatização da forma que os animais devem ser “usados” e tratados em uma sociedade, sendo um resultado das considerações da ciência e da ética, abordando os aspectos de custódia, transporte e manutenção dos sistemas de criação.

A ciência determina o grau de bem-estar animal por meio da avaliação objetiva, sem levar em conta a perspectiva da ética, dos chamados "indicadores de bem-estar", como os exemplificados na Tabela 2, sendo a alteração nos



parâmetros fisiológicos e comportamentais dos animais os principais indicadores utilizados (Silva & Borges, 2015), dentre esses parâmetros destacam-se: aumento das frequências respiratória e cardíaca, aumento na pressão arterial, elevação do nível sanguíneo de cortisol e glicose, atividade adrenal, resposta imunológica reduzida, abortos, comportamento de aversão, estereotípias, entre outros (Bayard, 2008; Cunningham, 2014).

Tabela 2 - Indicadores de grau reduzido e elevado de BEA.

<b>Grau Reduzido de BEA</b>	<b>Grau Elevado de BEA</b>
Expectativa de vida reduzida	Demonstração de uma variedade de comportamentos normais
Crescimento ou reprodução reduzidos	
Danos corporais, doenças, imunossupressão	
Tentativas fisiológicas e comportamentais de adaptação	Grau em que comportamentos fortemente preferidos podem ser apresentados
Grau de aversão comportamental	
Grau de supressão de comportamento normal	Indicadores fisiológicos e comportamentais de prazer
Grau de prevenção de processos fisiológicos normais e desenvolvimento anatômico	

Fonte: Adaptado de Bayard, 2008.

Quando o animal tem alteração em sua homeostase, como nas situações estressantes de pobre BEA, o Sistema Nervoso Simpático (SNS) é ativado para gerar uma resposta à emergência, na tentativa de voltar à homeostase. O SNS age sobre a medula adrenal, induzindo a produção de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), as quais agem sobre os órgãos que vão capacitar o animal a uma resposta de luta ou fuga, com o aumento da capacidade respiratória, do débito cardíaco e do fluxo sanguíneo para os músculos. Assim que a situação estressante passa, entra em ação o Sistema Nervoso Parassimpático (SNP), o qual tem como função a inibição do SNS,

fazendo com que o animal volte à normalidade (Cunningham, 2014).

A severidade dos danos causados pelo pobre BEA pode ser quantificada levando em consideração o grau de pobreza de bem-estar e a duração dessa condição, sendo que alguns critérios de BEA são mais pertinentes a curto prazo e outros, a longo prazo (Bayard, 2008).

## **2.2 As cinco liberdades na reprodução bovina**

### **2.2.1 Fome e sede**

As necessidades de ingerir alimento e água são essenciais em qualquer ser vivo, sendo um coeficiente de grande efeito na reprodução, visto que se os requisitos biológicos prioritários e essenciais do animal não forem atendidos, este não dirigirá os nutrientes necessários à reprodução, fazendo com que haja retardo e/ou supressão do ciclo reprodutivo (Dias et al., 2010). Além disso, caso ocorra gestação, pode haver perda embrionária e outras patologias, como a cetose e a hipocalcemia. Entretanto, os animais de produção sofrem com o descuido de alguns produtores em atender esse quesito imprescindível (Machado Filho et al., 2015).

No que diz respeito ao BEA, o principal indicador utilizado para avaliação dessa liberdade é o escore da condição corporal (ECC), sendo que, os extremos (muito magro ou muito gordo) não configuram situação de adequado bem-estar, pois ambos geram consequências negativas na fisiologia e comportamento do animal, incluindo a infertilidade (Mello et al., 2016).

A fome chega em um rebanho a pasto quando o pecuarista não se programa para estação de seca, ou seja, os bovinos ficam a mercê de um pasto de baixa qualidade, o qual não satisfaz suas necessidades nutricionais de vitaminas, minerais, proteínas e energia, fazendo com que perca em produtividade e diminua sua capacidade reprodutiva (Machado Filho et al., 2015). Isto posto, tem-se a necessidade de implementar manejos de suplementação nutricional a estes animais para melhorar a qualidade da dieta (Dias et al., 2010).

No touro, uma alimentação deficiente diminui a secreção de hormônio

luteinizante (LH), o qual é responsável pela secreção de testosterona, perturbando a funcionalidade do testículo, visto que, no macho, a testosterona é responsável pelas características sexuais secundárias, comportamento sexual e espermatogênese, além do desenvolvimento das glândulas sexuais acessórias (Hafez, 2004). Além disso, um macho subnutrido perde tanto peso vivo quanto testicular, o que pode ecoar na fertilidade da próxima estação, já que o animal necessita de um tempo para se restabelecer.

Um manejo nutricional deficitário, como a carência de vitamina A, também pode levar a patologias testiculares, tais como degeneração, ou orquite, especialmente nos touros mais jovens e em desenvolvimento (Mello et al., 2016). Por este motivo, o animal não consegue manter a própria saúde reprodutiva, o que leva a consequências em outro pilar do BEA, a quarta liberdade: "livre de dor e doenças", demonstrando que as liberdades estão relacionadas entre si e que o animal necessita que todas sejam atendidas para se configurar uma situação de adequado BEA.

O excesso de alimentação no touro, como já mencionado, também é prejudicial ao BEA e a sua capacidade reprodutiva, porque deixa os reprodutores obesos e ociosos, além de prejudicar a termorregulação testicular. A gordura excedente no cordão testicular causa hipertermia na região, reduzindo a reserva espermática epididimária e aumentando as patologias espermáticas (Cunha et al., 2015).

As fêmeas reprodutoras sofrem bastante com a falta de alimentação, visto que necessitam de nutrientes em todas as etapas reprodutivas, caso contrário sofrem com queda no desempenho. Quando estão vazias, precisam estar adequadamente nutridas para poderem cumprir com suas funções ovarianas; quando prenhas, é de suma importância para manutenção da gestação e apropriado desenvolvimento do feto; já quando no pós-parto, para a volta rápida à ciclicidade e diminuição no intervalo entre partos.

Nas vacas, o principal motivo associado à nutrição pela queda no desempenho reprodutivo é o balanço energético negativo (BEN) no pós-parto, o qual é responsável pela queda no ECC e consequente demora na volta à

ciclicidade. Quando a fêmea se encontra em BEN, há um aumento na concentração sanguínea de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) e outras substâncias, os quais prejudicam o funcionamento ovariano e a fertilidade da vaca (Sartori & Guardieiro, 2010).

O acesso à água é outra liberdade do bem-estar animal que é negligenciada com frequência pelos produtores, os quais não se atentam em deixá-la ao alcance dos animais em tempo integral. A obtenção irrestrita deste nutriente é de suma importância para todas funções biológicas e, dentre elas, a reprodução. Além da obtenção ilimitada deste recurso, é importante que seja de boa qualidade e não muito distante da localidade em que os bovinos estão. A sede causa intenso desconforto ao animal, reduzindo a produtividade e a ingestão de alimento (Machado Filho et al., 2015).

### **2.2.2 Desconforto**

O ambiente em que o bovino está diz muito sobre a situação de BEA em que este se encontra. A pasto, por exemplo, é importante que se tenha cobertura, seja natural ou artificial, para abrigar os animais e, dessa forma, garantir-lhes maior conforto e proteção contra a incidência solar e o frio. No confinamento, por sua vez, é significativa a escolha do piso e da cama sobre a qual estarão, além da quantidade de animais por área (densidade populacional). Outro fator de interesse dentro da segunda liberdade é o estresse térmico que os animais podem sofrer tanto em condição de confinamento quanto a pasto, caso o ambiente e as condições em que vivem não sejam favoráveis.

A reprodução é controlada por hormônios produzidos pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e para garantir sua eficácia, estes devem ser secretados em níveis adequados (Dukes, 2018). Entretanto, outro processo controlado por um eixo muito similar (hipotálamo-hipófise-adrenal), o qual utiliza dois órgãos em comum, é o da termorregulação (Santos et al., 2013). Dessa forma, um tópico de grande relevância dentro do BEA que afeta diretamente a aptidão reprodutiva de um bovino é o do estresse térmico, sendo que em países tropicais, como o Brasil, geralmente é caracterizado pelo excesso de calor.

O principal indicativo de que um animal está sofrendo uma situação de estresse é o aumento dos níveis de cortisol na corrente sanguínea. O cortisol interfere diretamente nas funções do hipotálamo e da hipófise, o que, conseqüentemente, gera diminuição na liberação de LH e FSH, afetando tanto os processos reprodutivos dos machos quanto das fêmeas (Cunningham, 2014). Em relação ao estresse calórico, outro bom marcador é a presença das HSPs (Heat Shock Proteins), ou seja, proteínas de choque térmico, as quais auxiliam no remodelamento de proteínas desnaturadas pelo calor (Leite, 2019).

No touro, para que a espermatogênese ocorra adequadamente, a temperatura escrotal deve ser de 2 a 6°C menor que a corporal (Menegassi et al., 2017). Sendo assim, quando há estresse calórico, a termorregulação testicular é afetada, acarretando em hipóxia nos tecidos testicular e epididimário e, conseqüentemente, em alterações na espermatogênese, o que faz com que haja um maior número de espermatozoides anormais, menor volume e concentração do ejaculado, além de diminuição da motilidade (Fernandes e Moraes, 2010; Costa, 2015; Cheng et al. 2016), sendo que, se o animal ficar exposto a esse estresse cronicamente, pode levar à degeneração testicular (Hafez, 2004). Além disso, o excesso de calor causa diminuição na libido, proveniente da baixa produção de LH e, conseqüentemente, da testosterona (Dukes, 2018; Silva, 2010), a qual, como já exposto anteriormente, é a responsável por estimular as características sexuais secundárias no macho.

Todos esses fatores implicam conseqüentemente na redução da aptidão e produtividade reprodutiva do touro. Essa injúria perdura por ainda algumas semanas após o animal sair da condição de estresse, visto que a produção de todas as etapas da espermatogênese dura por volta de 61 dias e que o estresse calórico afeta todas elas (Hafez, 2004). Logo, mesmo o tecido testicular tendo grande capacidade de regeneração e voltando à produção normal de espermatogênese após o término da injúria (Santos et al., 2005), o touro ainda demonstrará, por aproximadamente 6 semanas, os efeitos do estresse sofrido. Dessa forma, torna-se evidente a importância do manejo ambiental adequado para a performance reprodutiva de um macho.

Nas fêmeas, por sua vez, a capacidade reprodutiva é afetada pelo calor também por conta da baixa produção das gonadotrofinas LH e FSH, as quais são responsáveis pelo adequado funcionamento do ciclo estral e reprodução. O estresse calórico pode inativar as funções do ciclo estral, reduzir o tempo de manifestação do cio e a taxa de concepção, aumentar a mortalidade embrionária e acarretar em desenvolvimento fetal anormal (Barbosa & Damasceno, 2002; Neves et al., 2010; Oliveira et al., 2012; Limiro, 2020).

A reprodução de uma matriz é afetada pela diminuição da duração do estro, pois prejudica os manejos de monta natural e de inseminação artificial, por dificultar o diagnóstico do mesmo, reduzindo o índice produtivo da fazenda (Barbosa e Damasceno, 2002). O calor também pode reduzir a taxa de concepção entre 10% a 20% (Morelle, 2009) e, este quadro pode ocorrer por: a) falha no desenvolvimento folicular (Lew et al., 2006); b) aumento da temperatura intrauterina, reduzindo a sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutor feminino (Ansari-Mahyari et al., 2019) e mortalidade embrionária precoce, pois o embrião na fase inicial não tem o mecanismo de suportar o estresse calórico, visto que o aumento da resistência e maior produção de HSPs vem com o avanço no desenvolvimento (Carvalheira, 2019); ou c) redução no peso do corpo lúteo (CL) e da síntese de progesterona, causando aumento da secreção de prostaglandina, o que resulta em lise do CL e consequente morte embrionária (Oliveira et al., 2012). Já o desenvolvimento fetal anormal relaciona-se indiretamente com o estresse calórico, visto que é resultado da redução na alimentação, causada pelo comportamento do animal em diminuir a ingestão de alimento quando em situação de estresse térmico (Oliveira et al., 2012).

Todas as consequências acima refletem na eficiência reprodutiva da fêmea, causando aumento no intervalo entre partos e diminuindo os índices de produtividade da fazenda. Sendo assim, mostra-se a importância de se manter um adequado manejo ambiental para as fêmeas, tanto para as matrizes reprodutoras quanto para aquelas que serão receptoras e, portanto, responsáveis por manter a gestação e garantir o adequado desenvolvimento do feto.

### **2.2.3 Medo e ansiedade**

O medo e a ansiedade são parâmetros do BEA que entram em conflito e afetam a harmonização das outras liberdades, causando assim, mesmo que indiretamente, reflexos negativos na vida, manejo, produção e reprodução dos bovinos. A relação humano-animal está diretamente ligada com essa liberdade e, para que seja bem recebida pelos bovinos, o manejo deve ser feito com base em interações positivas, sendo necessário o entendimento da importância do BEA e do manejo positivo por parte do profissional responsável (Machado Filho et al., 2015).

Quando um bovino sofre com um manejador agressivo, este aumenta sua distância de fuga, ou seja, aquela distância mínima na qual o animal permite a aproximação do ser humano, dificultando o manejo (Machado Filho et al., 2015), demonstrando a importância de se ter um profissional treinado para não agredir o animal. O estresse da ansiedade por sua vez, como já visto anteriormente, ocasiona aumento da concentração sanguínea de cortisol, afetando a secreção de FSH e LH e, conseqüentemente, as funções reprodutivas.

### **2.2.4 Dor e doenças**

A sanidade física é uma condição óbvia ao BEA e que pode afetar diretamente os padrões reprodutivos de um bovino. Em outras palavras, todo animal precisa estar em condição de saúde para conseguir cumprir com seu papel reprodutivo de forma eficiente, sendo assim, quando um bovino está com dor ou possui alguma doença reprodutiva, isso interferirá diretamente em sua competência.

As doenças que afetam a reprodução podem tanto atingir diretamente o trato reprodutivo, quanto indiretamente, entretanto, em ambas as situações há o comprometimento do desempenho reprodutivo do rebanho. Por exemplo, algumas de origem infecciosa que não têm o sistema reprodutor como principal acometido, tais como diarreia viral bovina (BVD), rinotraqueíte infecciosa bovina são mesmo assim enfermidades de importância na reprodução. As demais patologias listadas a seguir têm sua importância no que diz respeito ao sucesso dos manejos

reprodutivos e na fertilidade dos animais, são elas: brucelose, leptospirose, cistos foliculares, freemartinismo, degeneração testicular e orquite.

A diarreia viral bovina (BVD) é uma patologia causada por um flavivírus que possui distribuição mundial e causa várias perdas na criação e reprodução dos bovinos. Possui diversas apresentações, podendo até mesmo ser assintomática, entretanto, um sinal clínico que se destaca é o aborto no início da gestação. Outro problema da infecção nas vacas gestantes é a possibilidade de nascimento de um animal permanentemente infectado (PI), ou seja, imunotolerante ao vírus, visto que esses animais permitem a permanência do mesmo no rebanho e são responsáveis pela sua disseminação, causando cada vez mais perdas econômicas (Angst et al., 2019; Bernardes et al., 2021).

A rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) é causada por infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1), a qual também possui distribuição mundial e causa perdas econômicas e reprodutivas. O herpesvírus, por sua vez, possui capacidade de se manter em latência e é reativado em situações de estresse ou imunossupressão (Oliveira, 2019). Em sua apresentação reprodutiva, causa morte embrionária e abortos nas fêmeas gestantes e, nos machos, pode provocar aderência peniana ao prepúcio e conseqüente recusa do touro em realizar a monta (Viu, et al., 2014; Zardo, 2017).

A brucelose é uma patologia de importância mundial, não apenas pelas perdas produtivas e barreiras comerciais que causa, mas também pelo seu caráter zoonótico (Alves Júnior, 2017). É causada pela infecção bacteriana por *Brucella abortus* e caracteriza-se por causar abortos, retenção de placenta, nascimento de bezerros fracos nas fêmeas, além de orquite e epididimite nos touros (Campaña et al., 2003; Brasil, 2003; Alves Júnior, 2017). Já a leptospirose é outra zoonose de grande importância e que acomete praticamente todos os animais domésticos e selvagens, incluindo os bovinos. Manifesta-se de duas formas: a) aguda, na qual o animal apresenta estado febril; ou b) crônica, onde se manifesta as alterações de falência reprodutiva, tais como aborto, natimortos, bezerros nascidos fracos ou prematuros (Oliveira et al., 2010; Santos, 2016).

A degeneração ou degenerescência testicular caracteriza-se por perda



na integridade do parênquima testicular e, em alguns casos, diminuição do testículo afetado (Soares, 2020). É uma condição que pode ser adquirida quando o touro encontra-se em situações de temperaturas adversas (na ausência da 2ª liberdade), deficiências nutricionais, gordura nos testículos (na ausência da 1ª liberdade), radiação, inflamações, traumas, genética ou idade avançada (Cunha, 2015; Soares, 2020). Pode ser uma condição temporária ou permanente, uni ou bilateral, sendo uma das maiores causas de baixa fertilidade ou, quando permanente, de infertilidade em touros (Mello, 2016). Dessa forma, é importante a identificação desses machos afetados, e seu tratamento quando possível, para não causar perdas econômicas se permanecerem no rebanho nessas condições.

A orquite é a inflamação do testículo, normalmente unilateral, e é facilmente diagnosticada pelo exame físico do touro durante o exame andrológico, sendo que além da dor e incômodo que causa ao animal, também há hipertermia da região, o que pode levar à degeneração do testículo adjacente (Soares, 2020).

O freemartinismo é a masculinização de uma fêmea bovina proveniente de uma gestação gemelar com um macho. Durante a gestão, a circulação é compartilhada e permite que os hormônios anti-mulleriano e testosterona, produzidos pelo macho, ajam sobre a fêmea, fazendo com que esta desenvolva características sexuais masculinas e acabe se tornando infértil (Lenzi, 2017). Por esse motivo, quando é realizada a transferência de embriões para uma receptora, tem-se o cuidado de transferir apenas um embrião, para que não haja a possibilidade de uma gestação gemelar e, por sua vez, um possível caso de freemartinismo.

O cisto folicular é uma estrutura semelhante ao folículo, porém afuncional, visto que passam por mudanças cíclicas (crescem e regridem, como um folículo), mas não ovulam (Hafez, 2004). Pode estar em um ou em ambos os ovários e estão relacionados com o inadequado funcionamento do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (Silva et al, 2002), infecções uterinas (Mateus et al., 2002) ou distúrbios metabólicos (Vanholder et al., 2006).

Vale lembrar que os manejos reprodutivos utilizados no rebanho também podem causar algum tipo de complicação futura ao animal. Por exemplo,

embriões produzidos *in vitro* têm a tendência de serem um pouco maiores, devido ao soro fetal bovino presente no meio de cultivo, sendo essa condição chamada de "síndrome do bezerro grande" e, por este motivo, podem ocorrer partos distócicos na propriedade (Bayard, 2008).

Com todas as patologias mencionadas anteriormente e seus impactos na reprodução, nota-se a importância das vacinas para se manter a sanidade do rebanho. Assim, os animais possuem melhor qualidade de vida, estão em uma boa situação de BEA e, conseqüentemente, que o produtor tem maior sucesso na produtividade e menores perdas econômicas.

### **2.2.5 Expressão de seu comportamento natural**

A quinta liberdade do BEA é facilmente atendida quando todas as outras estão em harmonia, visto que qualquer animal em situação de pobre BEA não será capaz de expressar sua naturalidade, por conta da injúria física e/ou mental causada em outra liberdade, gerando, por sua vez, comportamentos estereotipados.

O comportamento dos bovinos se modifica de acordo com suas necessidades, ou seja, quando alguma liberdade não é atendida adequadamente resulta na mudança comportamental em busca de suprir ou amenizar os efeitos causados, como por exemplo quando com fome e/ou sede, há o deslocamento dos animais em busca de comida e água. Quando em situação de desconforto, medo e ansiedade, os bovinos tendem a diminuir a ingestão de alimento, aumentam a ingestão de água, buscam abrigo e têm aversão àquilo que gera medo neles. Quando estão doentes, ficam apáticos e quietos. Com isso, torna-se evidente a importância em se atender as necessidades de BEA no rebanho (Machado Filho et al., 2015).

### **2.2.6 BEA e biotécnicas da reprodução**

As medidas de manejo reprodutivo geram impactos no BEA assim como este afeta o manejo, ou seja, a biotécnica utilizada em uma propriedade e sua eficácia depende do grau de bem-estar dos reprodutores bovinos e vice-

versa. Dessa forma, a análise individual do impacto de cada técnica utilizada no BEA é imprescindível para a avaliação da necessidade de estudo e desenvolvimento de novas técnicas menos invasivas (Bayard, 2008).

A sincronização de estro, por exemplo, é uma biotécnica favorável ao bem-estar, visto que tem como objetivo a parição em época oportuna, ou seja, quando a vaca estiver em situação de maior demanda nutricional, será a época de maior oferta de alimento. Além de gerar possibilidade de melhor supervisão da gestação e do parto (Bayard, 2008).

Outra biotécnica benéfica ao BEA é a criopreservação de sêmen e embriões, visto que diminui as situações de estresse durante o transporte dos reprodutores, o qual se torna dispensado. Ou seja, o uso dessas biotécnicas isenta o animal de passar por uma das situações que lhe causam maior estresse e diminuição no bem-estar, que é o transporte (Bayard, 2008).

Entretanto, alguns manejos podem causar ao animal situações que interfiram na qualidade de seu BEA, como por exemplo, a “síndrome do bezerro grande” em fetos produzidos *in vitro*, o que gera aumento na ocorrência de partos distócicos. Além do estresse momentâneo que algumas vacas podem sofrer durante os processos de inseminação artificial e transferência de embriões (Bayard, 2008).

### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Atualmente, a discussão e a importância dada ao BEA leva o produtor a ter mais atenção nas condições de criação de seus animais, não apenas por motivos éticos, mas também pela eficácia reprodutiva que promove e pelo maior índice de sucesso dos manejos e técnicas adotadas, com a produção aumentada e com valor diferenciado em seu produto. Dessa forma, torna-se evidente que quanto melhor for a qualidade de vida do bovino, melhor este desempenha suas funções reprodutivas e melhor será o retorno ao produtor.

#### 4. PARTE II - RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O estágio supervisionado obrigatório é uma matéria presente na grade curricular da graduação em Medicina Veterinária, na qual devem ser cumpridas 480 horas, sob a orientação de um docente da Universidade de Brasília e o prévio consentimento da empresa onde será realizado.

O estágio obrigatório foi cumprido de forma integral, de fevereiro de 2021 a maio de 2021, no laboratório da empresa BIO-Biotecnologia em Reprodução Animal (FIGURA 1), localizada em Brasília-DF, sob a supervisão do Médico Veterinário Dr. Maurício Antônio Silva Peixer, sócio executivo da empresa, e sob orientação do Professor Ivo Pivato.

A BIO-Biotecnologia em Reprodução Animal é uma empresa fundada no início dos anos 2000 por veterinários especializados na área de reprodução, focada no equilíbrio entre otimização produtiva e bem-estar animal. Conta com várias biotecnologias, dentre elas: Produção *In Vitro* de embriões (PIVE), Transferência e Criopreservação de Embriões (TE), Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), além de realizar análises andrológicas e avaliação de sêmen.



FIGURA 1 - Fachada da BIO-Biotecnologia em Reprodução Animal.

Fonte: BIO-Biotecnologia em Reprodução Animal.

A empresa possui 8 funcionários, sendo 4 veterinários, 1 técnico e 3 nas áreas de gestão, financeiro e esterilização. Seu ambiente interno é dividido em recepção, andrologia e sala de botijões de sêmen, sala de botijões de sêmen

e embriões, administrativo, gestão e laboratório PIVE. Seu ambiente externo é composto por sala de campo, sala de reuniões, copa, lavanderia e sala de lavagem e esterilização.

#### **4.1 Plano de Atividades**

Acompanhamento das atividades do laboratório, tais como: lavagem e esterilização; FIV de embriões bovinos; envase e congelamento de embriões; análise, resfriamento e congelamento de sêmen. Além do processamento de dados no sistema MultBovinos.

#### **4.2 Análise de sêmen**

A análise de sêmen realizada pela empresa consiste na avaliação das características físicas (concentração, motilidade e vigor) e morfológicas (patológicas) da amostra em questão.

É uma importante ferramenta para estabelecer a qualidade do ejaculado do touro e, conseqüentemente, sua eficácia reprodutiva. Geralmente é realizada para determinar a aptidão reprodutiva de um macho, antes de ser utilizado na estação de monta de uma propriedade, em um protocolo de PIVE, ou, até mesmo, para ser aprovado por alguma central de coleta de sêmen.

Na BIO, é realizado o exame de sêmen comercial envasado em palhetas para aferir sua qualidade. Um dos testes é a avaliação da motilidade.

A motilidade consiste no percentual total de espermatozoides móveis (CBRA, 2013), independentemente se seu movimento é linear ou não, e pode ser dividida em imóvel, circular ou progressiva. Quando os espermatozoides estão imóveis indica morte espermática e seu movimento é apenas de deriva. A circular é a que os espermatozoides estão vivos e móveis, mas seu deslocamento não é linear, ou seja, apresentam alguma alteração no trajeto, como por exemplo movimentar-se em círculos. Já a progressiva representa a porcentagem de espermatozoides que estão vivos, móveis e se deslocando de maneira linear e progressiva, ou seja, é a que demonstra de forma mais fiel o percentual de espermatozoides viáveis, isto é, que vão realmente conseguir fecundar um

ovócito.

O volume da amostra depende da palheta na qual foi envasada, sendo então dois os volumes possíveis: 0,5 mL ou 0,21 mL. É bom ressaltar que nas literaturas, a palheta "fina" comporta 0,25 mL, entretanto, na prática, por conta do diâmetro e comprimento da palheta e do volume ocupado pela bucha, a embalagem fina comporta apenas 0,21 mL de amostra de sêmen.

A observação do volume da palheta é importante no momento do cálculo da quantidade de células totais presentes na dose, dependendo de sua concentração, sendo que esse valor é calculado para se obter posteriormente o número de células móveis, para que a partir dessas informações, o produtor decida se utilizará ou não aquele sêmen em seu protocolo. Para se calcular o número de células por dose, divide-se a concentração pelo volume da palheta, e o valor de células móveis é obtido através da divisão do número de células por dose pela motilidade.

A concentração consiste no número de espermatozoides presentes por mL, sendo a concentração mínima  $350 \times 10^6$  espermatozoides/mL, num ejaculado de touro (CBRA,2013). Para se obter este parâmetro, pode-se utilizar o equipamento CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis) ou fazer a contagem de células na câmara de Neubauer, esse valor é introduzido a uma fórmula e o resultado é a concentração da amostra. A contagem de células na câmara é feita em zigue-zague, percorrendo todo o quadrante, contando as células da borda apenas em duas margens, na forma de L invertido.

Outro parâmetro avaliado na dose de sêmen é o vigor. O vigor é a intensidade com que a cauda do espermatozoide bate, sendo classificada de 0 a 5, em que 0 não apresenta movimento algum e 5 é o movimento de cauda em sua maior intensidade.

#### **4.2.1 Características físicas da dose seminal**

Tudo começa na recepção da amostra de sêmen criopreservado, na qual é de suma importância a correta identificação do seu endereço de armazenamento nos botijões da empresa, para que, quando for ser realizada sua

análise, seja facilmente e corretamente localizada.

No momento do exame, a palheta é colocada no descongelador de sêmen, o qual encontra-se na temperatura de 36°C. Após no mínimo 30 segundos de incubação, a amostra está descongelada e pronta para ser colocada no eppendorf. É importante lembrar que a prova de sêmen deve sempre se manter aquecida e, para não haver choque térmico e consequentes alterações espermáticas causadas por mau manejo, todos os eppendorfs utilizados para armazená-la são previamente colocados em uma placa aquecedora. Dessa forma, o eppendorf estará na mesma temperatura que o sêmen, evitando o choque térmico.

Ao retirar a amostra do descongelador, a mesma deve ser secada com o auxílio de um papel toalha. É importante ressaltar que a água é espermicida, pois altera a osmolaridade do meio extracelular, fazendo com que entre água na célula e esta se rompa, dessa forma, a secagem da palheta deve ser bem-feita para não correr o risco de inviabilizar as células. Para ser colocada no eppendorf, utiliza-se uma tesoura para cortar a extremidade da palheta oposta à bucha, a qual depois é empurrada com auxílio de um êmbolo, tomando bastante cuidado para que permaneça na palheta, pois se cair dentro do eppendorf, toda a amostra será contaminada e deverá ser descartada.

A depender do volume da palheta, a amostra precisará ou não de ser diluída para a avaliação de concentração, motilidade e vigor. Geralmente, amostras de 0,5 mL não necessitam de diluição, pois já são mais diluídas em comparação com a de palheta fina, na qual é utilizada uma solução chamada optiXcell 2 para promover sua diluição e melhor visualização no microscópio.

Estando todas corretamente identificadas, o próximo passo é colocá-las na Câmara Leja para a visualização no CASA, o qual faz contagem da concentração e motilidade de forma automática e precisa. O equipamento digitaliza imagens sucessivas dos espermatozoides e coloca-as em sequência, o que faz parecer um pequeno vídeo, no qual pode-se visualizar a trajetória percorrida pelo espermatozoide, como demonstrado na FIGURA 2, e classificar seu movimento como circular ou progressivo (Gallego, 2010), além de fornecer



mais 9 parâmetros de cinética espermática. Esse sistema é capaz de diferenciar o que está vivo e o que não está, facilitando e agilizando a análise. Já o vigor não é mensurado pelo equipamento, sendo este um parecer técnico dado pelo responsável pela análise.

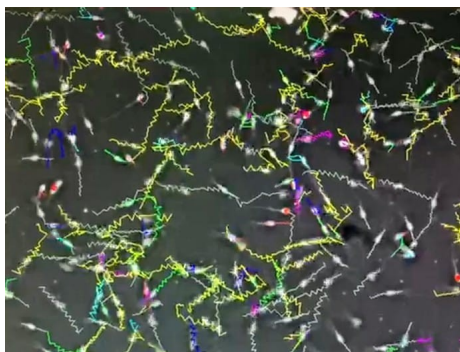


FIGURA 2 - Trajeto percorrido pelos espermatozoides registrado pelo equipamento CASA.

Fonte: BIO-Biotecnologia em Reprodução Animal.

Amostras diluídas em lactose não vão para o equipamento CASA, pois este diluente dificulta a visualização das células e o sistema não consegue fazer a leitura. Dessa forma, para ser avaliada de forma eficaz, é necessária coloração da amostra, para que a avaliação dos parâmetros de concentração, motilidade e vigor sejam feitas em um microscópio de fluorescência. Neste caso, o exame é feito totalmente pelo técnico responsável, o qual deve estar treinado para tal. A concentração é feita pela contagem na Câmara de Neubauer e seu valor é dado por fórmula como dito anteriormente. Vale lembrar que a avaliação no microscópio de fluorescência deve ser feita de forma rápida, pois este não mantém a amostra aquecida e os espermatozoides começam a morrer.

A avaliação de termo-resistência (TTR) mimetiza o tempo que o ejaculado permanece no trato genital de uma fêmea no cio (Cunha et al, 2012) e é feita em tempos de 30 minutos (TTR rápida) ou 4 horas (TTR lenta) depois do exame inicial (FIGURA 3), em que analisa-se novamente os parâmetros de motilidade e vigor. A TTR serve para determinar se a amostra continua viável ou não após certo tempo decorrido depois do descongelamento, sendo que o sêmen

apresenta bom resultado quando a motilidade permanece acima de 15% após o teste (Cunha et al, 2012).



FIGURA 3 - Placa aquecedora e eppendorfs contendo amostras de sêmen incubado para a realização da TTR.

Fonte: BIO-Biotecnologia em Reprodução Animal.

Os valores desejáveis para a amostra de sêmen avaliada ser considerada boa estão descritos na Tabela 3. Lembrando que o número de células móveis é obtido com base nos valores de concentração, células por dose e motilidade, como já descrito.

Tabela 3 - Características desejáveis para dose de espermatozoides congelados

Características	Valores	
Motilidade espermática	≥ 30%	
Vigor	≥ 3	
Número de células móveis	~ 10x10 <sup>6</sup>	
Espermatozoides normais	≥ 70%	
Defeitos maiores	<i>Totais</i>	≤ 10%
	<i>Individuais</i>	≤ 5%
Defeitos menores	<i>Totais</i>	≤ 20%
	<i>Individuais</i>	≤ 10%

Fonte: Adaptado de CBRA, 2013.

#### 4.2.2 Análise morfológica

A avaliação morfológica da amostra consiste na quantificação e

classificação dos defeitos encontrados nos espermatozoides. É uma análise importante para touros comerciais, pois algumas patologias culminam em menores taxas de fecundação e prenhez (Alcântara, 2017).

Para a análise da morfologia do sêmen é necessário que os espermatozoides estejam imóveis, caso contrário fica impossível determinar e avaliar a quantidade e quais são as patologias, visto que estes se locomoverão pela lâmina, dificultando a análise. Dessa forma, coleta-se uma pequena quantidade de sêmen (100 $\mu$ L) e coloca-o em um eppendorf contendo 50 $\mu$ L de formol citrato, o que interrompe o movimento e conserva a célula espermática.

A técnica usada para a avaliação da morfologia espermática adotada pelo laboratório Bio é a de câmara úmida sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). Assim, aproximadamente 4 $\mu$ L de amostra são colocados em uma lâmina, cobertos por uma lamínula e a avaliação é feita em um microscópio de contraste com interferência diferencial de fase, a qual dispensa o uso da lâmina corada. Avalia-se e conta-se cerca de 200 células, dentre elas células normais e anormais, diferenciando os defeitos maiores e menores.

Os defeitos maiores são aqueles de maior importância com relação à fertilidade do touro, pois são provenientes de falha dentro do testículo, são eles: acrossoma defeituoso, cabeça com contorno anormal, cabeça com *pouch formation*, cabeça estreita na base, cabeça isolada anormal, cabeça piriforme, cauda dobrada com gota distal, cauda enrolada na cabeça, cauda fortemente dobrada, *corkscrew defect*, formas teratológicas, gota citoplasmática proximal, *knobbed sperm*, peça intermediária e pseudo-gota. Já os defeitos menores são aqueles de menor efeito na fertilidade, oriundos de falhas extratesticulares, sendo eles: acrossoma desprendido, cabeça delgada, cabeça gigante, cabeça isolada normal, cauda dobrada, cauda enrolada, gota citoplasmática distal e implantação abaxial.

Na interpretação da morfologia espermática, considera-se que o total de defeitos pode atingir um limite de até 30% para que o touro seja considerado apto à reprodução, ou seja, se o percentual total das patologias superar essa marca, o touro é inapto. Para os defeitos maiores totais é considerado um limite

de 10% e para os menores totais, de até 20%. Também se analisa a porcentagem de defeitos maiores e menores individuais, sendo aceitos os limites de 5% e 10% respectivamente, como demonstrado na TABELA 3. Deve-se levar em conta, no momento da avaliação, a presença de outras células, como leucócitos, hemácias, células gigantes e primordiais (CBRA, 2013).

#### **4.2.3 Congelamento de sêmen**

O congelamento do sêmen bovino é uma técnica muito utilizada para preservação da amostra por período indeterminado, visando sua utilização futura. Para que seja bem-sucedida, deve-se escolher um diluente que garanta a sobrevivência dos espermatozoides à baixa temperatura, ou seja, além de fornecer nutrientes e tampões que impeçam mudança de pH, deve também ter potencial crioprotetor (Bayard, 2008).

Além da escolha do diluente, outro fator importante é o cálculo da diluição do sêmen, visto que, como já visto, a concentração da amostra e o conseqüente número de células móveis são parâmetros avaliados após a descongelação. Dessa forma, para o envase e congelamento em palhetas de 0,21 mL, o cálculo é feito à razão de 20 milhões de espermatozoides por dose e em palhetas de 0,5 mL, de 30 a 40 milhões de espermatozoides por dose (Bayard, 2008).

Na Bio, antes do cálculo de diluição e do início do processo de congelamento, faz-se uma análise inicial para determinar os parâmetros de motilidade, vigor, concentração e turbilhonamento, além do volume do ejaculado. O envase, por sua vez é feito de forma artesanal, sendo que o técnico responsável deposita uma das extremidades da palheta (a que não contém a bucha) no recipiente contendo o ejaculado diluído e, pela outra extremidade, suga o conteúdo até que chegue à bucha, depois retira-se o excesso com o auxílio do pente e, por fim, a obliteração da palheta é feita com álcool polivinílico.

Após o envase, as palhetas contendo a amostra são resfriadas e mantidas assim por algumas horas, para evitar o choque térmico. O congelamento propriamente dito é feito de duas formas na Bio, a) com o auxílio

de uma curva de congelamento ou b) pela técnica da “caneca suspensa”. No dia seguinte ao congelamento, descongela-se uma das doses e outra análise é realizada para ver se o congelamento foi bem sucedido.

#### **4.3 Laboratório de PIVE**

É neste laboratório que se realizam todas as etapas relacionadas com a produção de embriões, desde a recepção dos ovócitos ao envase e congelamento dos embriões. Tudo tem início na preparação do laboratório para a recepção dos ovócitos, com a temperatura do ambiente entre 23°C a 30°C e a montagem prévia das placas de MIV (maturação *in vitro*) de acordo com o número de ovócitos coletados.

Os ovócitos, vindos da fazenda, chegam em uma transportadora, ou seja, numa maleta de transporte contendo uma garrafa térmica de banho-maria a seco, a qual os mantêm a uma temperatura de 38,2°C. Já dentro do laboratório, os tubos da primeira placa são colocados sobre uma mesa aquecedora, para mantê-los na temperatura correta e, os demais são guardados na estufa a 38°C até o momento de serem transferidos para a placa de Petri.

Os criotubos e o meio de maturação devem ser posicionados sobre uma bancada contendo fluxo laminar para iniciar o processo de lavagem e acondicionamento na placa de MIV. Três gotas do meio, para cada tubo, são colocadas em uma tampa da placa de Petri, depois deve-se retirar os ovócitos de cada criotubo e, com o auxílio de um estereomicroscópio, colocá-los na primeira gota. A lavagem dos ovócitos de cada doadora é feita de forma individual e consiste na passagem dos mesmos pelas 3 gotas, no intuito de retirar o meio de coleta para a sua introdução no meio MIV. Ao final de cada lavagem, os ovócitos devem ser transferidos para sua respectiva gota na placa de maturação.

Assim que se completa a transferência para a placa de MIV, a mesma deve ser incubada em estufa, com temperatura, umidade e atmosfera gasosa controladas, onde permanecerá por um período de aproximadamente 24 horas, contadas a partir da entrada dos ovócitos na transportadora, para que ocorra a maturação dos ovócitos.

#### **4.3.1 Maturação de ovócitos**

O processo de maturação é uma das fases mais importantes da produção *in vitro* de embriões, já que inclui todos os acontecimentos que fazem com que o ovócito manifeste máximo desempenho no desenvolvimento após a fecundação (Gottardi & Mingoti, 2009).

Os ovócitos recém aspirados ainda estão inábeis a passarem pelo processo de fecundação, sendo necessário que sejam maturados, ou seja, que passem por uma série de modificações nucleares e citoplasmáticas, além de alguns processos bioquímicos (Bueno, 2008), para que se tornem aptos a passar pelos demais processos de FIV e CIV, terminando no desenvolvimento de um embrião viável.

Em condições *in vivo*, a maturação ocorre após um pico pré-ovulatório de LH, fazendo com que o ovócito saia da condição de prófase I e continue sua divisão meiótica para o estágio de metáfase II. Em condições de aspiração folicular, a maturação inicia-se no momento em que o ovócito é retirado do folículo, mas para que esse evento seja realizado de forma eficiente, o meio MIV deve mimetizar as condições naturais de maturação *in vivo* (Bueno, 2008).

O método de maturação utilizado no laboratório Bio é aquele em que há suplementação do meio de maturação com soro fetal bovino (SFB). Depois de passado seu tempo de incubação, os ovócitos apresentam a extrusão do primeiro corpúsculo polar e estão prontos para passarem pelo processo de fecundação *in vitro*.

#### **4.3.2 Fecundação *in vitro* (FIV)**

A FIV consiste na união de uma pequena amostra de sêmen com os ovócitos em uma única gota de meio de fecundação. Entretanto, para a realização adequada de tal procedimento, algumas etapas devem ser cumpridas antes.

O primeiro passo a ser cumprido é a produção do meio de fecundação, que deve ser estabilizado na estufa por 1 hora após sua confecção. A placa de fecundação deve ser preparada após a preparação do meio FIV, a qual deve ser

identificada com o nome da fazenda e com a sigla "FIV". As gotas de meio na placa deverão ser identificadas com o número da vaca e apenas 10 ovócitos viáveis serão depositados por gota. Feito isso, deve-se cobrir as gotas com óleo mineral.

Os ovócitos devem ser retirados da placa de MIV e transferidos para a de FIV. Para isso, realiza-se novamente o procedimento de lavagem, cujo princípio é o mesmo da anterior, ou seja, deposita-se 3 gotas de meio FIV em uma tampa de placa de Petri e os ovócitos, são passados de gota em gota no intuito de se lavar o meio MIV, lembrando que é realizada de forma individual para cada doadora. Ao final de cada lavagem, deposita-se os ovócitos em sua respectiva gota na placa de fecundação, a qual é levada para a estufa de estabilização até que se comece o procedimento da fecundação.

O preparo da amostra de sêmen é uma etapa importante a ser realizada antes do início da FIV, sendo que o sistema de separação pelo gradiente de Percoll é o método mais comum para se obter a fração espermática viva após o descongelamento (Bueno, 2008). O descongelamento é feito com o auxílio de um descongelador a 36°C, depois realiza-se a secagem (etapa importante pelo efeito espermicida da água, já mencionado anteriormente) e deposição das palhetas sobre uma placa aquecedora, para se manterem aquecidas e não acontecer choque térmico. Para a deposição no eppendorf contendo o Gradiente Percoll (preparado previamente pelo técnico do laboratório), corta-se ambas as extremidades da palheta, utilizando uma tesoura diferente para cada amostra, sendo que todo esse processo é realizado no fluxo laminar. O eppendorf então é levado a uma centrífuga e centrifugado de acordo com a tabela de protocolo de touros. Terminada a centrifugação, novamente no fluxo laminar, retira-se o sobrenadante e o sedimento é suspenso com meio de fecundação. Nova centrifugação é realizada, o sobrenadante descartado e o pellet de espermatozoides suspenso novamente com meio FIV.

No momento da FIV, a placa a ser fecundada deve ser retirada da estufa e depositada no fluxo laminar, sobre a mesa aquecedora. A fecundação é feita com o auxílio de um pipetador e um estereomicroscópio e, como já dito,

consiste na deposição de uma pequena amostra de sêmen (com concentração final de cerca de  $1 \times 10^6$  espermatozoides vivos por mL de meio FIV), com os ovócitos da doadora na gota de meio FIV. Neste momento, deve-se ter bastante atenção para realizar os acasalamentos/cruzamentos de forma correta. Após o término das fecundações, a placa retorna para a estufa, onde deverá permanecer por 24 horas.

#### **4.3.3 Cultivo *in vitro* de embriões (CIV)**

O cultivo *in vitro* de embriões consiste no desenvolvimento do ovócito fecundado até o estágio de blastocisto (Bueno, 2008), sendo nesse processo que ocorre a fase de divisão celular (clivagens).

O CIV deverá ser iniciado de 18 a 20 horas após o início da FIV, sendo que a produção do meio de cultivo e a preparação da placa de CIV são realizadas previamente ao início do procedimento. A placa de cultivo é preparada de forma similar à de fecundação, ou seja, também é identificada com o nome da fazenda, mas agora com a sigla “CIV” e a distribuição das gotas segue a mesma organização. Após a montagem das placas, as mesmas devem ser mantidas na estufa de estabilização, por 1 hora antes do início do cultivo.

Mais uma vez é necessária a realização de lavagem para trocar os zigotos de um meio para o outro, seguindo o mesmo princípio das anteriores. Desta forma, os zigotos de cada doadora serão retirados da placa de FIV e lavados em três gotas de meio CIV antes de sua deposição em sua respectiva gota na placa de cultivo, como ilustrado na FIGURA 4, lembrando que a cada acasalamento/cruzamento troca-se a ponteira utilizada.



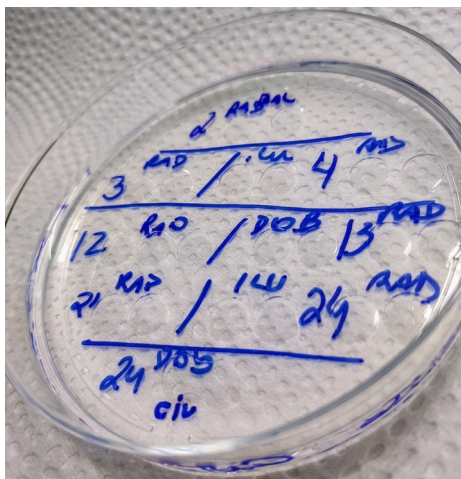


FIGURA 4 - Organização da placa de CIV.

Fonte: BIO-Biotecnologia em Reprodução Animal.

Terminada a montagem das placas, deve ser feita a passagem de gás em todos os cultivos, para isso, as placas de CIV são guardadas na estufa de baixa tensão de  $O_2$  (*incubator chamber*) e uma mangueira conectada ao cilindro de gás é também conectada na *incubator chamber*. Este procedimento dura 5 minutos, marcados no cronômetro e, passado esse tempo, desliga-se o registro do gás.

A *incubator chamber* então é guardada na estufa, onde ficará por 7 dias até o envase dos embriões produzidos. No quarto ao sexto dia, as placas são retiradas da estufa para a realização do *feeding* e previsão de embriões. O *feeding* consiste na troca do meio CIV antigo por outro confeccionado naquele mesmo dia, tomando cuidado para não retirar nenhum embrião junto com o meio antigo. Os embriões grudados na placa deverão ser suspensos.

Os embriões são o produto da FIV, formados depois de uma sucessão de clivagens dos ovócitos fecundados. São classificados em 3 estágios (Bx, Bl ou Bi), de acordo com seu estágio de desenvolvimento e probabilidade de sucesso na prenhez. Tal classificação vem da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), a qual normatizou os critérios para classificação morfológica de embriões bovinos produzidos, usando códigos numéricos que vão de 1 a 9 (COT 59 Embrapa, 2009).

O blastocisto inicial (Bi) é o que possui desenvolvimento em estágio inicial, em que as células começam a secretar líquido para o espaço intracelular, formando a blastocele. O blastocisto (Bl) é aquele em estágio de desenvolvimento um pouco mais avançado, em que a blastocele aumenta de tamanho e fica maior do que a massa celular interna. O blastocisto expandido (Bx) é aquele que teve expansão da blastocele e maior desenvolvimento do trofoblasto, algumas vezes pode estar eclodido. Quanto mais avançado em seu estágio de desenvolvimento, maiores as chances de o embrião produzido *in vitro* terminar em prenhez (COT 59 Embrapa, 2009).

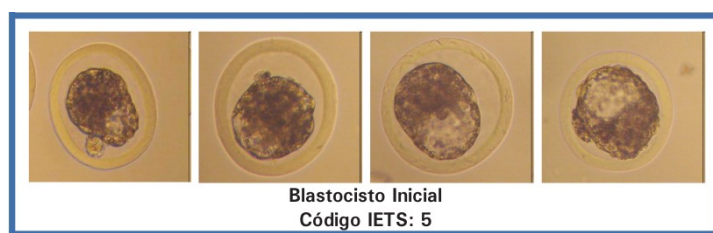


FIGURA 5 - Embriões em estágio de desenvolvimento Bi.

Fonte: Comunicado Técnico 59 Embrapa, 2009.

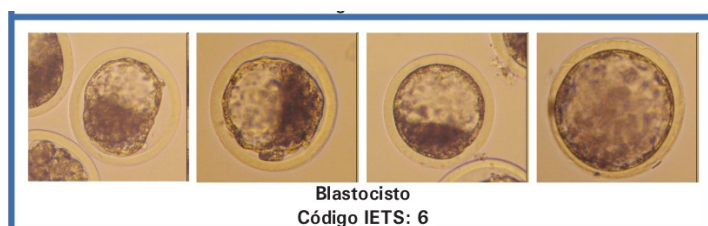


FIGURA 6 - Embriões em estágio de desenvolvimento Bl.

Fonte: Comunicado Técnico 59 Embrapa, 2009.

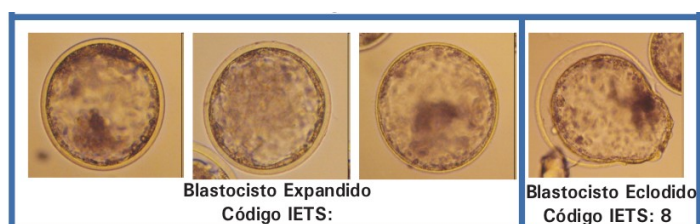


FIGURA 7 - Embriões em estágio de desenvolvimento Bx e Bx eclodido.

Fonte: Comunicado Técnico 59 Embrapa, 2009.

#### 4.3.3.1 Envase a fresco

O envase a fresco consiste no armazenamento individual de cada embrião em uma palheta de 0,25 mL, a fim de que sejam transferidos para suas respectivas doadoras no dia seguinte. Para a realização desse procedimento, algumas etapas devem ser cumpridas previamente, como a produção do meio de TE-FIV.

Após o *feeding* e a previsão de embriões produzidos, deve ser feita identificação dos lacres das palhetas de envase. Os lacres são separados em cores distintas para cada acasalamento/cruzamento, respeitando o número da previsão (1 laque para cada embrião previsto), são identificados utilizando caneta permanente com o número de registro (RGD) da doadora e, caso esta divida acasalamento/cruzamento, o nome do touro também deve constar na identificação do laque. Identificados, os lacres são colocados na mesma sequência que a das doadoras em uma raque, assim como demonstrado na FIGURA 8.

Também é importante a organização da bancada e o preenchimento da ficha de envase de embriões, a qual manterá o controle do número de embriões produzidos e suas classificações. Na ficha deve ser preenchida com o nome da fazenda, data de envase e cada acasalamento em seu respectivo campo (com RGD da doadora e nome do touro), para posteriormente ser completada com o número de embriões envasados por doadora e sua classificação.



FIGURA 8 - Organização da bancada auxiliar para o envase de embriões a fresco, com lacres identificados, sacolés, mesa aquecedora na temperatura adequada e ficha de envase.

Fonte: BIO-Biotecnologia em Reprodução Animal.

Realizadas todas essas etapas de preparação e organização, dá-se início ao procedimento de envase de embriões a fresco. Antes do envase, deve-se novamente realizar a lavagem dos embriões, entretanto dessa vez será realizada em apenas uma gota de meio TE-FIV para cada doadora individualmente e, depois, os embriões serão transferidos para a placa de envase.

A placa de envase deve ser colocada sobre o estereomicroscópio, para se determinar a quantidade de embriões produzidos e classificá-los de acordo com sua qualidade em Bx, BI ou Bi para que o auxiliar anote na ficha de envase, a fim de manter o controle. Então, os embriões são distribuídos nas gotas de envase, separados em grupos. O envase é iniciado pelos Bxs, seguidos pelos Bls e, por fim, os Bis, realizado de forma individual para cada embrião.

Para o envase, a palheta de 0,25mL é acoplada pela extremidade oposta à bucha a uma seringa adaptada e deve-se seguir uma ordem de preenchimento conforme a FIGURA 9. Ao final do envase de cada estágio de desenvolvimento, as palhetas são depositadas sobre a mesa aquecedora da bancada auxiliar para que o técnico auxiliar as lacre. Estando corretamente lacradas, as palhetas com os embriões envasados são colocadas em seus respectivos sacolés identificados (em Bx, BI ou BI) sobre a placa aquecedora, conforme ilustrado na FIGURA 8.

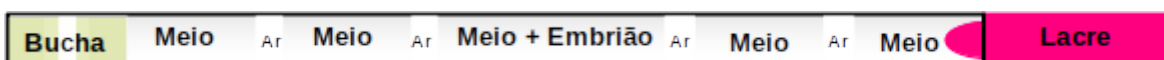


FIGURA 9 - Esquema de preenchimento da palheta de envase a fresco.

Terminado o envase de todos os embriões da fazenda, os mesmos serão armazenados na transportadora, demonstrado na FIGURA 10, a qual estará previamente ligada e estabilizada a 38°C. Os embriões são colocados de acordo com seu estágio de desenvolvimento, ou seja, primeiro todos os Bxs, depois os Bls e, por fim, os Bis.

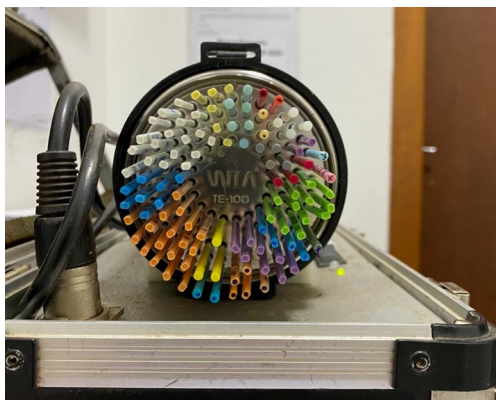


FIGURA 10 - Embriões BX1 na transportadora de embriões.

Fonte: BIO-Biotecnologia em Reprodução Animal.

Também é possível realizar o envase de embriões em tubos, em que serão envasados no estágio de desenvolvimento em mórula (MO). Neste caso, uma boa quantidade de lacres é separada, mas não identificadas, e a ficha de envase é preenchida com os acasalamentos/cruzamentos, nome da fazenda e, no espaço para o preenchimento da quantidade de e classificação dos embriões envasados, todos serão preenchidos como MO, pois serão quantificados e classificados no laboratório da fazenda onde serão transferidos. Após a deposição dos embriões nos tubos contendo meio CIV, estes são armazenados na transportadora de ovócitos, para segurança e manutenção da temperatura adequada durante o transporte, visto que os embriões ainda estão em desenvolvimento.

A transferência de embriões é uma importante biotécnica de melhoramento zootécnico, já que proporciona maior acurácia na seleção animal. Para que seja bem empregada, é preciso cuidar para que não ocorra contaminação em nenhum dos seus processos, para que se tenha menos risco de transmissão de doenças (Honorato et al, 2013).

Para que se tenha sucesso no melhoramento zootécnico, deve-se escolher com cuidado a doadora de ovócitos e o touro doador de sêmen, mas também é extremamente importante o cuidado com o bem-estar e com manejo nutricional e sanitário das receptoras, já que precisam estar em condições de

responder aos tratamentos hormonais de sincronização, além de estarem aptas para receber os embriões e manter a gestação (Honorato et al, 2013).

#### 4.3.3.2 Congelamento de embriões

O congelamento de embriões consiste na criopreservação dos mesmos entre D7 e D8, em nitrogênio líquido. Cada embrião, que se encontra no estágio de desenvolvimento de Bx, é envasado de forma individual em uma palheta de 0,25 mL e passa por todo um processo de congelamento, o qual será detalhado a seguir.

Os protocolos de MIV, FIV e CIV para o congelamento são muito parecidos com o de envase a fresco, apenas algumas pequenas alterações são realizadas na produção dos meios. Os lacres são separados também de acordo com o número da previsão, sendo 1 lacre para cada embrião previsto. A identificação porém é um pouco diferente, pois deve possuir em um rótulo impresso, o qual será colado no lacre, com: RGD da doadora e do touro, data do congelamento, raça resultante do acasalamento/cruzamento e estágio de desenvolvimento do embrião (Bx). A máquina de congelamento deve ser estabilizada previamente a  $-6^{\circ}\text{C}$  na curva de congelamento 1, com o auxílio do nitrogênio líquido.

A lavagem dos embriões no meio TE-FIV, envase e colocação do lacre nas palhetas deve ser realizada no tempo máximo de 9 minutos, para evitar desidratação dos embriões. Assim, apenas uma pequena quantidade de embriões é envasada por vez. O envase será realizado na palheta de 0,25 mL, a qual será preenchida com 3 colunas do crioprotetor etilenoglicol, separadas por 2 colunas de ar, conforme a FIGURA 11. É importante deixar a bucha bem umedecida, para que o risco dela se deslocar e sair seja menor.

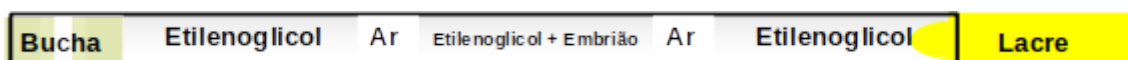


FIGURA 11 - Esquema de preenchimento da palheta para criopreservação.

Terminados os 9 minutos, os embriões devidamente lacrados são posicionados na *criochamber* da máquina de congelamento, como demonstrado na FIGURA 12, por 5 minutos cronometrados. Passado este tempo, realiza-se o procedimento de *seeding*, o qual nunca deve ser realizado na coluna de meio central, a que contém o embrião. O *seeding* consiste na indução da cristalização da região extracelular, fazendo com que o congelamento do etilenoglicol anteceda o do embrião, para que, dessa forma, haja uma lenta retirada de água do meio intracelular do mesmo, promovendo um adequado congelamento do embrião (Ongaratto, 2009).

Os embriões continuam na máquina de congelamento até que a temperatura atinja  $-32^{\circ}\text{C}$ , depois dessa marca, as palhetas são retiradas da *criochamber* e introduzidas de forma rápida diretamente no nitrogênio líquido. Por fim, os embriões são separados por acasalamento e acondicionados em sua respectiva raque identificada com o RGD da doadora, a qual é posteriormente guardada no botijão de armazenamento de embriões.

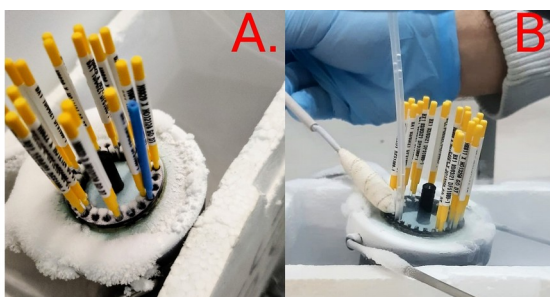


FIGURA 12 - Congelamento de embriões. A. Embriões posicionados na *criochamber*; B. *Seeding* da coluna de meio da bucha.

Fonte: BIO-Biotecnologia em Reprodução Animal.

#### 4.4 Sistemas MultBovinos

O MultBovinos é um sistema de gestão pecuária, o qual visa servir a todos os elos da cadeia produtiva, mantendo o controle automatizado de cada manejo realizado.

O sistema mantém o controle de aspirações foliculares, estoque de

sêmen, fertilização *in vitro*, produção, transferência e congelamento de embriões, protocolos de IATF, diagnóstico de prenhez e sexagem fetal. Também realiza o controle de fêmeas prenhes, partos, mortes embrionárias, abortos, desmame de animais. Além de possuir funções administrativas como produção de gráficos e relatórios de cada manejo realizado.

#### **4.5 Esterilização**

Na rotina laboratorial, vários materiais são reutilizados e, para isso, necessitam passar por um processo de limpeza e esterilização. Na Bio, os materiais que passam por esses processos são: lacres de envase de embriões, jalecos, caixas de ponteiras e os materiais utilizados no campo.

A limpeza consiste na retirada de sujidades orgânicas e inorgânicas com o auxílio de água e sabão. É importante que todos os resíduos sejam retirados, pois estes atrapalham no processo de esterilização (Leite, 2008). A limpeza pode ser feita de forma manual ou automatizada, com o auxílio de lavadoras ultrassônicas, as quais emanam ondas de energia acústica que quebram as ligações que prendem a sujeira na superfície do produto (Resolução - RDC Nº 15, 2012).

Antes de qualquer procedimento ser realizado na sala de esterilização, é realizada a lavagem das mãos com detergente extran 2% e enxague com água deionizada, depois deve-se calçar luvas de procedimento e higienizá-las com álcool 70%. Esse processo é importante para que não haja contaminação durante a manipulação dos equipamentos.

##### **4.5.1 Materiais do laboratório de PIVE**

A limpeza dos jalecos é feita com lavagem na máquina, depois são deixados em uma estufa por aproximadamente 2 dias, até que sequem. Depois, os mesmos são embalados em sacos plásticos de polipropileno e levados para o laboratório.

Os lacres usados no envase, depois da transferência dos embriões, voltam para serem esterilizados e reutilizados em novos envases. Para isso, ao



chegar na sala de lavagem e esterilização, um por um é conferido para retirar, se necessário, as pontas de palheta que porventura fiquem acopladas a eles. Depois, todos ficam de molho em uma solução de álcool 98°GL por 2 minutos (FIGURA 13), movimentando-se um pouco o pote, depois deixa-os por mais 10 minutos ali. Essa etapa é para a retirada da identificação dos lacres escritos com caneta permanente.

O próximo passo é ficar de molho em álcool 70% por um dia e, passado esse tempo, são colocados sobre um papel toalha até que sequem (FIGURA 13). Depois de secos, os lacres são colocados em um recipiente previamente higienizado com álcool 70% e separados por cores com o auxílio de uma pinça anatômica. Cada grupo de cor é então colocado em um saco plástico de polipropileno de camada dupla (FIGURA 13), lacrados e cada saquinho é identificado com data e segue para ser autoclavado. Após a autoclavagem as embalagens contendo os lacres são levados para o almoxarifado do laboratório de PIVE.



FIGURA 13 - Etapas da esterilização dos lacres para envase a fresco. 1. Lacres de molho em álcool 98°GL; 2. Lacres de envase secando após molho em álcool 70%; 3. Lacres em camada dupla de sacos plásticos de polipropileno esperando para serem autoclavados.

Fonte: BIO-Biotecnologia em Reprodução Animal.

O laboratório de PIVE tem uma altíssima demanda de ponteiras, as quais precisam estar corretamente esterilizadas para o sucesso nos procedimentos realizados ali. Dessa forma, as caixas de ponteiras, depois de esvaziadas pelo uso, são encaminhadas à sala de esterilização e lá são higienizadas com álcool 70% e deixadas em uma bancada limpa até que todo o

álcool evapore. Depois de secas, são preenchidas com as ponteiras, tomando sempre o cuidado de não tocar nas pontas nem onde são acopladas ao pipetador. Após estarem completas, as caixas são embaladas em camada dupla de sacos plásticos de polipropileno e encaminhadas para a autoclave.

#### **4.5.2 Materiais de campo**

Alguns dos materiais utilizados na aspiração folicular de ovócitos também passam por um processo de lavagem e esterilização antes de serem reutilizados. As vestimentas como macacões, jalecos e pijamas passam pelo processo de lavagem em máquina e secam ao sol. Já os demais materiais passam por um longo processo de esterilização, o qual será detalhado a seguir.

Materiais como mandril, ponteiras e filtros coletores de ovócitos, assim que chegam na sala de esterilização, são deixados em um recipiente contendo extran 2% por 24 horas. Passado esse tempo, os mesmos serão lavados com o auxílio de bucha no detergente e enxaguados com água deionizada, sendo muito importante, nesse momento, verificar se não há resíduos de sangue no mandril. Então, os materiais vão para uma lavadora ultrassônica por 20 minutos, depois vão a uma estufa para secagem, por 24 horas. Depois de secos, o mandril e os filtros são empacotados em 2 sacos plásticos de polipropileno, identificados com data e encaminhados para a sala de campo para ser reutilizados. As ponteiras, por sua vez, são autoclavadas, depois ficam em uma estufa de secagem por mais um dia, são identificadas com data e, por fim, disponibilizadas na sala de campo para reutilização.

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O ESTÁGIO OBRIGATÓRIO**

O uso de biotecnologias para melhorar o desempenho zootécnico de uma fazenda é uma realidade cada vez mais difundida pelo Brasil. O conhecimento da correta aplicação das biotécnicas da reprodução animal é um diferencial no ramo e de extrema importância para o avanço da pecuária brasileira.

O estágio obrigatório supervisionado na BIO-Biotecnologias em Reprodução Animal foi um período de muito engrandecimento da minha formação profissional e de acréscimo a minha experiência prática na área de reprodução animal. Os profissionais que ali trabalham influenciam a busca pelo conhecimento mais aprofundado das práticas e inspiram o esforço em ser um médico veterinário capacitado.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÂNTARA, M. V. C. **Avaliação andrológica em touros de alto valor zootécnico**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília, Brasília, DF. junho 2017.

ALVES JÚNIOR, J. A. **Brucelose em bovinos no estado da Paraíba (2006-2015)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) - Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, 2017.

ANGST, J. P. S; Moreira, D. M; Floss, B. D; Machado, R. S; Dalenogare, C. S; Siqueira, L. C. **Diarreia viral bovina: revisão de literatura**. XXIV Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão. Cruz Alta, Rio Grande do Sul, 2019.

ANSARI-MAHYARI, S; Ojali, M. R; Forutan, M; Riasi, A. **Investigating the genetic architecture of conception and nonreturn rates in Holstein cattle under heat stress conditions**. Tropical Animal Health and Production, v 1, p 1-7, 2019.

BARBOSA, O.R; Damasceno, J.C. **Bioclimatologia e bem estar animal aplicados à bovinocultura de leite**. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, Junho, 2002.

BAYARD, P. D. G; Figueiredo, J. R; Freitas, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed. São Paulo, 2008.

BERNARDES, A. S; Dornelles, R. D; Taschetto, P. M; Kleinubing, M. F; Brandolt, I. M. C; Rodrigues, A. P. C; Duarte, C. A; Casagrande, F. P. **Infecção pelo vírus da diarreia viral bovina - relato de caso**. Brazilian Journal of Development, Curitiba, v.7, n.1, p. 2158-2161, Janeiro, 2021.

BRAGA, J. S; MACitelli, F; Lima, V. A; Diesel, T. **O modelo dos “cinco domínios” do bem-estar animal aplicado em sistemas intensivos de produção de bovinos, suínos e aves**. Revista Brasileira de Zootecias 19(2): 204-226. 2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose**, Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº 15**, de 15 de março de 2012.

BROOM, D. M; Molento, C. F. M. **Bem-estar animal: conceito e questões relacionadas - revisão**. Archives of Veterinary Science v. 9, n. 2, p. 1-11, 2004.

BROOM, D.M. **Indicators of poor welfare**. British Veterinary Journal, London, v.142, p.524-526, 1986.

BUENO, A. P; Beltran, M. P. **Produção *in vitro* de embriões bovinos**. Rev. Cien. Elet. Med. Vet - ISSN 1679-7353, Garça, SP. Ano VI, número 11, julho de 2008.

CARVALHEIRA, L. R. **Desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos**

**expostos ao choque térmico e ao fator estimulador de colônia 2.** Tese de Pós-graduação em Ciência Animal - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2019.

CAMPAÑA, R. N; Gotardo, D. J; Ishizuca, M. M. **Epidemiologia e Profilaxia da Brucelose Bovina e Bubalina.** Coordenadoria de Defesa Agropecuária CDA/SAA. Campinas, São Paulo, 2003. 20p.

CBRA, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 3 ed., Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.

CHENG, Y; Liu, S; Zhang, Y; Su, D; Wang, G; Lv, C; Zhang, Y; Yu, H; Hao, L; Zhang, J. **The effects of heat stress on bull sperm quality and related HSPs expression.** *Animal Biology*, v 66, p 321-333, 2016.

COSTA, D. F; Souto, D. V. O; Rocha, E. F; Guimarães, L. J; Silva, M. R; Souza, B. B; Silva, G. A. **Influência do estresse calórico na fisiologia hormonal de bovinos.** *Agropecuária Científica no Semiárido*, v. 11, n. 2, p. 33-38, 2015.

CUNHA, M. S; Bonato, D. V; Taira, A. R; Teixeira, P. P. M. **Degeneração testicular em machos: dos animais ao homem.** *Revista Investigação*, v. 14, n. 6, p. 54-61, 2015.

CUNHA, E. R; Da Silva, C. G; Martins, C. F. **Estudo comparativo dos testes de termo-resistência rápido, lento e fisiológico em sêmen criopreservado bovino importado.** *Anais da 49ª reunião anual da Soc. Bras. Zootec.*, Brasília, DF. 2012.

KLEIN, B. G. **Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária.** Tradução da 5. ed. Blacksburg, Virginia, 2014.

DE ARRUDA, R. P; Celeghini, E. C. C; Garcia, A. R; Santos, G. C; Leite, T. G; Oliveira, L. Z; Lançon, R; Rodrigues, M. P. **Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade**. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.39, n.1, p.47-60, jan./mar. 2015.

DIAS, J. C; Ramos, A. F; Venício, J. A; Emerick, L. L; Martins, J. A. M; Souza, F. A. **Alguns aspectos da interação nutrição-reprodução em bovinos: energia, proteína, minerais e vitaminas**. PUBVET, Londrina, V. 4, N. 5, Ed. 110, Art. 738, 2010.

DUKES, H.H. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 13° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2018. 725p.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Circular Técnica 41**. São Carlos, SP, dezembro, 2005.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Comunicado Técnico 59**. Juiz de Fora, MG, 2009.

FERNANDES, C. E.; Moraes, J. C. F. **Avaliação clínica e exame de sêmen no touro**. Embrapa Pecuária do Sul: Livro científico, 81p; 2010.

FRASER, A. F; Broom, D. M. **Farm Animal Behaviour and Welfare**. Wallingford: CABInternational, 1990.

GALLEGO, A. M. **Avaliação das características da motilidade (CASA), morfologia e funcionalidade da membrana plasmática (HOST) de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo**. Dissertação (Pós-graduação em Reprodução Animal) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2010.

GOTTARDI, F. P; Mingoti, G. Z. **Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião**. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.33, n.2, p.82-94, abr./jun. 2009.

HAFEZ, E. S; Hafez, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri, 2004.

HAMMERSCHMIDT, J. MOLENTO, C.F.M. **Protocolo De Perícia Em Bem-Estar Animal Como Subsídio Para Decisões Judiciais Em Casos De Maus-Tratos Contra Animais**. Universidade Federal do Paraná -UFPR, Curitiba. 2014, p. 423-425.

HONORATO, M. T; Costa Ferro, R. A; Costa Ferro, D. A; Dos Santos, K. J. G; Costa, M. A; Filho, J. L. R. **Importância da escolha de receptoras em um programa de transferência de embriões em bovinos**. PUBVET, Londrina, V. 7, N. 19, Ed. 242, Art. 1601, outubro de 2013.

LEITE, F. B. **Central de material esterilizado - projeto de reestruturação e ampliação do Hospital Regional de Francisco Sá**. Francisco Sá, MG, 2008.

LEITE, A. C. **Choque térmico no desenvolvimento *in vitro* de oócitos e embriões bovinos e estratégias para incrementar a qualidade embrionária**. Tese de Pós-graduação em Ciência Animal - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2019.

LENZI, G. P. **Caracterização macroscópica, microscópica e ultrassonográfica de patologias do trato reprodutivo de fêmeas bovinas provenientes de abatedouro**. Dissertação de Pós-graduação em Ciência Animal - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2017.

LEW, B. J.; Meidan, R.; Wolfenson, D. **Concentrações hormonais e**

**desenvolvimento folicular de vacas leiteiras em hipertermia sazonal aguda.** Belo Horizonte: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2006.

LIMIRO, W. B. **Influência do estresse térmico na reprodução de bovinos.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia). Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Goiás, 2020.

MACHADO FILHO, L. C. P; Machado, T. M. P; Mello, D. F. M; Honorato, L. A. **Bem-estar de bovinos em pastagem.** III Simpósio de Produção Animal a Pasto, p.273-312, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Maringá, PR, 2015.

MATEUS, L; Da Costa, L. L.; Bernardo, F; Silva, J. R. **Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows.** *Reprod. Domest. Anim.*, v.37, n.1, p. 31-35, 2002.

MATOS, D. L; Araújo, A. A; Roberto, I. G; Toniolli, R. **Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura.** *Rev. Bras. Reprod, Anim.*, Belo Horizonte, v.32, n.4, p.225-232, out./dez. 2008.

MELLO, R. R. C; Ferreira, J. E; Mello, M. R. B; Palhano, H. B. **Influência do manejo na fisiologia reprodutiva do macho bovino.** *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama*, v. 19, n. 1, p. 57-63, jan./mar. 2016.

MENEGASSI, S. R. O; Pereira, G. R; Dias, E. A; Rocha, M. K; Carvalho, H. R; Kertz Jr, C; Oberst, E. R; Barcellos, J. O. J. **Infrared thermography as a noninvasive method to assess scrotal insulation on sperm production in beef bulls.** *Andrologia*, v 50, p 1-8, 2017.

MORELLE, P. **Estresse térmico na reprodução de vacas leiteiras.** Monografia. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu; 2009.



NEVES, J. P; Miranda, L. M; Tortorella, R. D. **Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI**. Brasília: Revista brasileira de zootecnia, ISSN; 2010.

OLIVEIRA, F. C. S; Azevedo, S. S; Pinheiro, S. R; Batista, C. S. A; Moraes, Z. M; Souza, G. O; Gonçalves, A. P; Vasconcelos, S. A; **Fatores de risco para a leptospirose em fêmeas bovinas em idade reprodutiva no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 30, n.5, p.398-402, 2010.

OLIVEIRA, M. S; Tiburcio, M; Ferreira, S. G. C. **Influência do estresse térmico sobre a reprodução de bovinos de corte**. Maringá: CESUMAR, curso de Medicina Veterinária; 2012.

OLIVEIRA, L. **Prevalência de Diarreia Viral Bovina e Rinotraqueíte Infecciosa Bovina no rebanho leiteiro do município de Curitibanos/SC**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Catarina, Curitibanos, SC, 2019.

ONGARATTO, F. L. **Criopreservação de embriões bovinos**. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2009/2.

QUEIROZ, R.G. **Percepções a respeito do bem-estar animal no Brasil**. Dissertação (Mestrado em Agronegócio) – Faculdade de Administração, Ciências Contábeis e Economia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2018.

SANTOS, K. J. G; Melo, C. S; Pales, A. P. **Seleção de touros através da puberdade, maturidade e fatores envolvidos na fertilidade**. Revista Eletrônica da Faculdade de Montes Belos, v. 1, n. 1, p. 72-87, 2005.

SANTOS, K. J. G; Santos, A. P. P; Costa, M. A; Silva, L. S.; Ferrero, D. A. D; Dib, R. T. **Efeito do estresse sobre os processos reprodutivos em fêmeas bovinas**. Londrina: Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia; 2013.

SANTOS, R. F. **Caracterização soropidemiológica da infecção por *Leptospira* spp. em rebanhos bovinos de corte do estado de Mato Grosso do Sul**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2017.

SARTORI, R; Guardieiro, M. M. **Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina**. R. Bras. Zootec., v.39, p.422-432, 2010.

SILVA, L. A. F; Coelho, K. O; Machado, P. F; Silva, M. A. M; Moura, M. I; Barbosa, V. T; Barbosa, M. M; Goulart, D. S. **Ovarian follicular cysts in dairy cows: An abnormality in folliculogenesis**. Dom. Anim. Endocrinol., v.23, p.167–177, 2002.

SILVA, R. A. G. **Marcadores do estresse calórico** (tese). Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do sul; 2010.

SILVA, A. A; Borges, L. F. K. **Conceitos e Considerações sobre o Bem Estar Animal na Produção de Bovinos – Revisão Bibliográfica**. Cruz Alta, RS, 2015.

SOARES, R. O. G. **Exame andrológico em bovinos - Utilização da ultrassonografia no despiste de patologias**. Relatório final de estágio (Mestrado integrado em Medicina Veterinária) - Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2020.

VANHOLDER, T.; Opsomer, G.; De Kruif A. **Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review**. Reprod. Nutr. Dev., v.46, n.2, p.105-119, 2006.

VIU, M. A. O; Dias, L. R. O; Lopes, D. T; Viu, A. F. M; Ferraz, H. T. **Rinotraqueíte infecciosa bovina: revisão**. PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia., Londrina, v. 8, n. 4, p.1- 21, fev. 2014.

ZARDO, R. **Prevalência e variáveis associadas à infecção por BoHV-1, BVDV, Leptospira spp. e Neospora caninum em bovinos leiteiros no município de Novo Xingu-RS**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.