

FABRÍCIO RASI DE ALMEIDA PRADO

TÉCNICAS DE SUPEROVULAÇÃO, COLHEITA E TRANSFERÊNCIA
DE EMBRIÕES EM BOVINOS

BOTUCATU-SP

2005

FABRÍCIO RASI DE ALMEIDA PRADO

TÉCNICAS DE SUPEROVULAÇÃO, COLHEITA E TRANSFERÊNCIA
DE EMBRIÕES EM BOVINOS

Monografia apresentada à disciplina
“Seminários I” do programa de pós-
graduação em Medicina Veterinária,
nível mestrado, área de concentração
em Reprodução Animal da Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia da
UNESP, Campus de Botucatu.

Mestrando: Fabrício Rasi de Almeida Prado.

Orientador: Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo.

Professores Responsáveis: Prof. Adj. Dr. Sony Dimas Bicudo.

Prof^a. Adj. Dra. Maria Denise Lopes.

BOTUCATU-SP

2005

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – Bovine serum albumin

CIDR – Dispositivo intravaginal de liberação controlada de droga

CL – Corpo Lúteo

DPBS – Dulbecco phosphate buffer solution

E₂ - Benzoato de estradiol

eCG – Gonadotrofina coriônica eqüina

FSH – Hormônio folículo estimulante

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas

IA – Inseminação artificial

IATF – Inseminação artificial em tempo fixo

LH – Hormônio luteinizante

P₄ – Progesterona

PGF_{2a} – Prostaglandina F_{2a}

PRL – Prolactina

TE – Transferência de embriões

LISTA DE FIGURAS

TABELA 1 Números médios de embriões.....	12
FIGURA 1 Lavagem uterina para colheita dos embriões.....	18
FIGURA 2 Líquido oriundo da lavagem uterina passando pelo filtro retendo o embrião.....	19
FIGURA 3 Avaliação morfológica dos embriões.....	22
FIGURA 4 Inovulação embrionária em uma vaca receptora.....	23

INTRODUÇÃO

Os índices reprodutivos e produtivos da pecuária brasileira estão muito abaixo do desejável. Os aumentos na produção de leite, nas últimas décadas, foram em parte muito mais devido à expansão das áreas exploradas e aumento do efetivo de rebanho do que pelo aumento real da produtividade. Quanto mais maximizada for a produção, através da utilização de biotecnologias como inseminação artificial, sincronização estral, transferência de embriões e fecundação *in vitro*, tanto maior será a exigência de uma ótima eficiência reprodutiva (NEVES et al., 2002).

A primeira transferência de embriões (TE) com sucesso foi realizada em 1951 na Universidade de Cornell, nos Estados Unidos (KANAGAWA et al., 1995). Em função do importante papel econômico e social dos rebanhos zebuínos na pecuária brasileira e do interesse nacional e internacional na aquisição e multiplicação de animais de elevado valor genético, o mercado de embriões ampliou-se bastante nos anos noventa (FONSECA et al., 2001). A produção de embriões bovinos *in vivo*, através da superovulação de doadoras e posterior lavagem uterina, é consagrada mundialmente como forma eficiente de multiplicação rápida dos melhores indivíduos de um rebanho.

Balieiro et al. (1999), demonstrou que as tendências anuais fenotípicas, genéticas e de ambiente para intervalo de partos foram negativas na raça Gir. Apesar da pequena magnitude, geneticamente conclui-se que o intervalo de partos diminuiu um a dois dias/ano. Reduções pequenas foram observadas não somente na raça Gir, como em mestiços, e mudanças genéticas negativas expressivas de -3,08 até 12,0 dias/ano foram observadas na Índia, em animais da raça Guzará, e de -21,4 dias/ano na raça Holandesa criada no Brasil.

A rápida multiplicação de material genético melhorado na raça Gir é de grande importância para o aumento da produção de leite nos países tropicais (RAMOS et al., 2000).

Quase 90% das transferências de embriões com finalidade comercial em todo mundo, são feitas em bovinos (leiteiros e de corte). São nessas espécies que as técnicas estão mais desenvolvidas (CARDELLINO & OSÓRIO, 1999).

Nos bovinos, o desenvolvimento folicular apresenta a particularidade de, na maioria dos animais, consistir de duas ou de três ondas de crescimento, sendo cada onda formada por um grupo de folículos com diâmetro maior ou igual a 4mm. Ressalta-se que a emergência da terceira onda folicular está associada com uma fase luteínica mais prolongada. O aproveitamento mais racional desses folículos que se tornariam atrésicos pode ser obtido por meio da superovulação. A superovulação pode ser definida, portanto, como um método de estimular diversos folículos terciários desenvolverem até o estágio de pré-ovulação, com subsequente ovulação (REICHENBACH et al., 2002).

O acompanhamento diário das estruturas ovarianas por ultra-sonografia tem mostrado que os bovinos apresentam ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral. Vacas e novilhas podem ter duas ou três ondas por ciclo, com um folículo tornando-se dominante em cada uma delas. Por isso, uma população de pequenos, médios e grandes folículos é encontrada em cada ovário, durante todos os dias do ciclo estral (BORGES et al., 2001).

Para o melhoramento zootécnico, a técnica de TE é um importante instrumento porque acelera e confere maior precisão no processo de seleção animal (REICHENBACH et al., 2002).

A variação do número de embriões após diferentes tratamentos superovulatórios tem sido atribuída a fatores individuais, utilizando tratamentos idênticos, obtiveram respostas altamente variáveis. Em relação às concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) presentes no extrato pituitário comumente usado para estimular a resposta ovulatória, encontraram melhores resultados em preparações com baixa concentração de LH, salientando que as altas concentrações de LH causam ovulação prematura ou luteinização de folículos ocasionando baixa resposta superovulatória (VISINTIN et al., 1999).

O objetivo desta revisão é mostrar os métodos atualmente utilizados em protocolos de superovulação, colheita e transferência de embriões em bovinos, com ênfase na raça Gir Leiteiro.

REVISÃO DA LITERATURA

1. SUPEROVULAÇÃO E INSEMINAÇÃO DE DOADORAS

Denomina-se superovulação ao aumento do número fisiológico de ovulações próprias da espécie, provocada mediante a administração de gonadotrofinas. No bovino, se considera que houve resposta ao tratamento quando se produzem mais de duas ovulações. A superovulação deve complementar-se com um regime ótimo de inseminação artificial, utilizando sêmen de muito boa qualidade (CABODEVILA & TORQUATI, 2001).

O hormônio folículo estimulante (FSH) tem função essencial no desenvolvimento dos folículos. O uso de FSH exógeno para induzir a superovulação é baseado nessa função fisiológica. Folículos em vários estágios de desenvolvimento estão normalmente presentes nos ovários, em qualquer tempo. Grupos consecutivos de folículos pequenos crescem, maturam e se degeneram ou ovulam. O FSH estimula o crescimento dos folículos pequenos. FSH exógeno reverte a atresia de folículos acima de 1,7mm. O hormônio luteinizante (LH) estimula a produção de andrógenos na teça interna. Andrógenos tecaais são usados como precursores para a produção de estrógenos pelas células granulosas que foram estimuladas pelo FSH (BÉNYEI & BARROS, 2000).

Os animais das raças zebuínas são mais sensíveis aos medicamentos em comparação com os das raças européias. Animais da raça Nelore possuem ovários, folículos e corpos lúteos menores, o que pode estar relacionado à exigência de menor concentração de FSH para a indução da superovulação (VISINTIN et al., 1999).

Algumas diferenças endócrinas poderiam estar contribuindo para a obtenção de estágios embrionários mais avançados em zebuínos quando comparados com os obtidos em taurinos. Fêmeas *Bos indicus* geralmente atingem a puberdade mais tarde, têm período de gestação mais longo, exibem anestro pós-parto prolongado e apresentam importante sazonalidade reprodutiva, isto é, tendem a serem acasaladas em dias longos. Quanto ao ciclo estral, apresentam estro mais curto e em menor intensidade, e tendência em não permitir a monta por outras fêmeas. Outro importante aspecto divergente entre taurinos e zebuínos são as características do corpo lúteo (CL). O CL é primariamente reconhecido por sua

habilidade de sintetizar e secretar progesterona. O corpo lúteo é formado a partir da hiperplasia e diferenciação das células da granulosa e da teca do folículo ovulatório passa de 200 miligramas no momento da ovulação (células foliculares) a 48 gramas de peso no 11º dia do ciclo estral nas raças zebuínas. Esse peso é consideravelmente maior nas raças européias. O peso do CL está relacionado com sua capacidade de produzir progesterona, hormônio intimamente relacionado com a manutenção de um ambiente útero-tubárico adequado ao desenvolvimento embrionário e manutenção do próprio CL durante o período crítico da vida embrionário (da ovulação à implantação), quando ocorre o reconhecimento materno da gestação. Fêmeas zebuínas apresentaram CL menor, com menor conteúdo de progesterona por grama de tecido luteal (FONSECA et al., 2001).

O controle farmacológico do ciclo estral e da ovulação de vacas zebuínas (*Bos taurus indicus*) depende primeiramente do entendimento do comportamento fisiológico reprodutivo da vaca, o qual está ligado diretamente com seu estado nutricional e condição, parida ou solteira (MOREIRA, 2002).

A alta variabilidade de respostas aos tratamentos gonadotróficos têm motivado a realização de estudos com a finalidade de formular protocolos com capacidade de estabilizar e racionalizar os programas de superovulação (ANDRADE et al, 1999).

Dois fatores muito importantes agem na variação da resposta ovariana: tratamento com gonadotrofinas por protocolo e condição ovariana e o tempo de tratamento com gonadotrofinas (ALVAREZ et al., 1998).

O crescimento folicular pode ser sincronizado com diferentes drogas tal como progesterona, estradiol, uma combinação de progesterona e estradiol, GnRH. O emprego de progesterona ou progestágenos em doses elevadas pode suprimir o suporte de LH para o folículo dominante e induzindo assim atresia do folículo (THATCHER et al., 2001).

O LH excessivo durante o tratamento de superovulação causa a ativação prematura dos oocistos. Em vacas superovuladas com FSH, a alta concentração de LH resultou em baixa fecundação (BÉNYEI & BARROS, 2000).

O crescimento dos folículos ovarianos em bovinos ocorrem em um padrão denominado ondas de crescimento folicular, onde em um ciclo há normalmente a emergência de duas ou três ondas de crescimento folicular. Durante o ciclo estral

uma onda de folículos emerge entre os dias 1 e 3 após o estro. São geralmente, em torno de 10 à 50 folículos neste grupo com o tamanho de 2 à 3mm cada. Nos dias subsequentes, parte desses folículos crescem para 4 à 6mm, sendo que 2 à 5 folículos maiores do grupo continuarão a crescer enquanto que os outros regridem. Neste grupo de folículos pelo menos um continua a crescer e torna-se dominante onde neste momento é denominada divergência, após isso essa onda na maioria das vezes inicia sua atresia (MOREIRA, 2002).

O tratamento superovulatório deve ser realizado no começo de uma onda folicular, antes da seleção do folículo dominante, para obter-se a melhor resposta possível (BÓ, 2002).

O número de ondas por ciclo parece estar associado com a duração do ciclo estral e com a duração da fase luteínica. Isto pode ser demonstrado pelo surgimento de novas ondas de crescimento folicular quando se prolonga a fase luteínica pela administração de progesterona exógena. O folículo dominante presente na fase em que ocorre a luteólise torna-se ovulatório (BORGES et al., 2001)

Injeções de FSH exógeno (eCG ou FSH) são amplamente utilizadas em programas de ovulação múltipla/transferência de embriões para aumentar o fornecimento de embriões de animais de qualidade genética. Aplicações subcutâneas ou intramusculares de eCG ou FSH estimulam o crescimento de folículos adicionais, os quais ovulam espontaneamente sem a necessidade de LH ou hCH exógeno em vacas, búfalas, ovelhas e cabras (JAINUDEEN et al., 2004).

O hormônio mais usado atualmente para tratamentos superovulatórios em bovinos é o FSH, comercialmente representados no Brasil pelo Pluset®¹ e Folltropin®-V².

O tratamento superovulatório não promove o desenvolvimento folicular e sim, fornece aqueles folículos que normalmente se tornariam atrésicos, um meio hormonal adequado para que continuem seus processos de maturação, culminando com a ovulação (DINIZ et al., 1999).

¹ PLUSET® Laboratorios Calier, Espanha

² FOLLTROPIN-V® Bioniche Animal Health – Ontário Canadá

Em vacas adultas, um ciclo de duas ondas é predominante, e o folículo dominante na segunda onda folicular tornando-se um folículo pré-ovulatório e ovulando posteriormente (WOLFENSON et al., 1999).

Em bovinos, o cortisol endógeno liberado pelo stress pode suprimir o pico de LH e ovulação ou diminuir a resposta superovulatória, que poderia confundir a sensibilidade para gonadotrofinas exógenas (COSTA et al., 2001).

Existem diversos protocolos de superovulação, utilizando o cio natural ou em qualquer fase do ciclo estral. No cio natural inicia-se o tratamento superovulatório entre o 8 a 12 dias após a manifestação do estro, coincidindo com o início da segunda onda folicular. Realiza-se 8 aplicações de FSH com intervalos de 12 horas, para aumentar o recrutamento dos folículos. No terceiro dia da superovulação realiza-se 2 aplicações de prostaglandina com o intuito da luteólise do corpo lúteo, para que haja redução da progesterona e conseqüente pico de LH, ocorrendo assim a ovulação (BÓ, 2002). Como se segue o protocolo abaixo.

Protocolo 1

Dia	0	10	11	12	13	14	15
Manhã	Estro	FSH	FSH	FSH	FSH	Cio	IA
Tarde		FSH	FSH	FSH PGF _{2a}	FSH	IA	

A utilização do benzoato de estradiol em protocolos de superovulação é utilizado com a função de suprimir o desenvolvimento folicular e sua resposta em tratamentos superovulatórios, sendo mais eficaz quando combinado com aplicação intramuscular de progesterona (P4) intramuscular na introdução de implante vaginal, CIDR®³, ou auricular, CRESTAR®⁴, de progesterona. Segue o protocolo abaixo.

³ CIDR® Pharmacia Animal Health, Kalamazoo, MI - USA

⁴ CRESTAR® Intervet International B.V. Boxmeer-Holanda

Protocolo 2

DIA	0	4	5	6	7	8	9
MANHÃ	P4 + E2 ?CIDR	FSH	FSH	FSH	FSH ?CIDR	CIO	IA
TARDE		FSH	FSH	FSH PGF _{2a}	FSH	IA	

O objetivo do tratamento superovulatório em bovinos é o de obter o número máximo de embriões fertilizados e transferidos com alta probabilidade de ocorrência de prenhes (MAPLETOFT et al., 2002).

1.1 SUPEROVULAÇÃO EM VACAS DA RAÇA GIR LEITEIRO

A fonte mais provável de variabilidade das respostas ovarianas a estimulação exógena por gonadotrofinas, poderia ser a fase do ciclo estral em que a fêmea se encontra no início do tratamento (D INIZ et al., 1999).

A variação individual e o tipo de hormônio são fatores importantes que interferem na resposta superovulatória. O estado ovariano no momento do tratamento parece ser fator determinante na resposta superovulatória, sendo uma característica constantemente pesquisada para elevar o índice de recuperação de embriões viáveis. Existem outros componentes da dinâmica folicular, como o tamanho, a distribuição e as condições dos folículos antrais que podem afetar a resposta ovulatória frente ao tratamento hormonal (VISINTIN et al., 1999).

Em diversos protocolos de superovulação utilizados em vacas da raça Gir Leiteiro existe uma dosagem de FSH que demonstrou melhor resultado. Utilizado 300, 400 ou 500 UI de PLUSET®⁵ teve uma superovulação melhor e com uma maior produção de embriões viáveis na concentração de 400 UI de FSH (Tabela 1). Segue abaixo o protocolo utilizado.

⁵ PLUSET® Laboratorios Calier, Espanha

Protocolo 3

DIA	0	5	6	7	8	9	10
MANHÃ	P4 + E2 ?CIDR	FSH	FSH	FSH	?CIDR	CIO	IA
TARDE		FSH	FSH	FSH PGF _{2a}		IA	

TABELA 1: Números médios de embriões viáveis, estruturas totais, vacas em estro da raça Gir Leiteiro superovuladas com 300, 400 ou 500 UI de FSH. Dados da APIL AGROPECUÁRIA LTDA - 2004

	300	400	500
Número Vacas em estro	25 14 (66%)	26 18 (69,23%)	16 12 (75%)
Embriões viáveis	1,44	2,92	1,63
Estruturas totais	3,6	4,92	2,88

Donaldson (1984), demonstrou que apesar de que se cumpra com todos os requisitos, a resposta superovulatória resulta em muita variação. Um estudo que envolveu 1263 doadoras, somente 68% das fêmeas induzidas a superovulação produzirão embriões transferíveis.

As dosagens utilizadas no experimento não foi a recomendada pelo fabricante, onde o mesmo indica a concentração para vacas adultas taurinas de 500UI de PLUSET®⁶ ou 400mg de FOLLTROPIN®-V⁷. A indicação para vacas zebuínas é de 50% do valor citado anteriormente. Quando há resposta exagerada (formação de muitos CLs por ovário) ou excesso de folículos não ovulados, sugere-se a redução da dosagem ou troca do hormônio.

Segundo Cabodevila & Torquati (2001), os efeitos negativos de altas doses de gonadotrofinas se relacionam com os fenômenos de superestimulação ovárica. Os animais superestimulados, geralmente se obtêm também uma menor taxa de coleta (ovócitos e embriões em função dos corpos lúteos palpados ou observados). Têm-se dedicado para ela seguintes razões:

⁶ PLUSET® Laboratorios Calier, Espanha.

⁷ FOLLTROPIN-V Bioniche Animal Health – Ontário, Canadá.

- Retenção de ovócitos nos folículos luteinizados e nos corpos lúteos;
- Retenção de ovócitos e/ou embriões nos ovidutos;
- Níveis muito alto de estrógenos produzidos pelos grandes folículos não ovulados que bloqueariam a capacidade de captação das fímbrias com a conseguinte caída de ovócitos na cavidade abdominal.

1.2 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM DOADORAS

Nem sempre a ovulação está sincronizada nos tratamentos superovulatórios e, portanto existem dificuldades no acerto das inseminações realizadas, levando á recuperação de inúmeras estruturas não fecundadas. A má observação do estro e a experiência do técnico, também podem levar a este resultado. O GnRH e o LH tem sido muito utilizado para o controle da ovulação. A aplicação de um ou outro hormônio, sincroniza a ovulação permitindo a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). A prostaglandina mais utilizada em protocolos é o Veteglan®⁸ na dose de 2ml, 150µg de D+Cloprostenol, e o LH mais utilizado é o Lutropin®-V⁹, na dose de 2,5ml, 12,5mg, e o GnRH é o Fertagyl®¹⁰ na dosagem de 2ml ou seja 0,2mg. Abaixo alguns protocolos utilizados em IATF em doadoras.

Protocolo 4

DIA	0	10	11	12	13	14	15
MANHÃ	CIO	FSH	FSH	FSH	FSH	IA	IA
				PGF _{2a}		GnRH	
TARDE		FSH	FSH	FSH	FSH	IA	
				PGF _{2a}			

⁸ VETEGLAN® Laboratorios Calier, Espanha.

⁹ LUTROPIN®-V Bioniche Animal Health – Ontário, Canadá

¹⁰ FERTAGYL® Intervet International B.V. Boxmeer-Holanda

Protocolo 5

DIA	0	4	5	6	7	8	9
MANHÃ	P4 + E2 ?CIDR	FSH	FSH	FSH	FSH ?CIDR	LH	IA
TARDE		FSH	FSH	FSH PGF _{2a}	FSH	IA	

Protocolo 6

DIA	0	4	5	6	7	8	9
MANHÃ	P4 + E2 ?CIDR	FSH	FSH	FSH	FSH ?CIDR	IA	IA
TARDE		FSH	FSH	FSH PGF _{2a}	FSH	IA GnRH	

2. TRANSFERÊNCIA E COLHEITA DE EMBRIÕES

Os principais tipos de hormônios esteróides envolvidos nos processos reprodutivos da fêmea são os progestágenos e estrógenos. O progestágeno mais importante é a progesterona, a qual é produzido pelo corpo lúteo (CL), a placenta e córtex adrenal. A síntese de progesterona pelo CL é controlada pelo hormônio luteinizante (LH) no animal não gestante; a prolactina (PRL) também mantém o CL (efeito luteotrópico) em algumas espécies, particularmente em ratas, camundongas e ovelhas. Os locais de produção de estrogênio são: ovários (células da granulosa dos folículos ovarianos), a unidade fetoplacentária e o córtex adrenal. A síntese ovariana de estrogênio é controlada pelo hormônio folículo estimulante (FSH), que atua nas células da granulosa. O LH também desempenha um papel vital na síntese do estrogênio, na qual controla a produção da molécula precursora essencial (testosterona) pelas células da teca interna (STANBENFELDT & EDQVIST, 1996).

Os embriões bovinos, destinados a um programa de TE são obtidos por métodos não cirúrgicos. Sua coleta e transferência com êxito dependem de vários fatores. Em primeiro lugar da vitalidade destes para

sobreviverem e chegar a término depois de terem sido recoletados do trato genital, avaliados *in vitro* e transferidos a uma receptora, através de meios e temperatura. O método utilizado na colheita dos embriões é o circuito fechado com fluxo descontínuo. Neste método se utiliza um cateter de duas vias, um tubo em “Y” de PVC estéril, uma bolsa com líquido de lavagem (PBS) e um filtro coletor de embriões estéril. A sonda de Foley utilizada é a de uso humano, devido ao seu baixo custo em relação ao de uso animal. Este possui vários tamanhos onde sua utilização é de acordo com o diâmetro da luz cervical.

Com a revolução tecnológica da biotecnologia ocorrida no início dos anos 70, a transferência de embriões sedimentou-se universalmente por se constituir uma técnica que permite, com grande eficiência e velocidade, obter-se o crescimento e a produtividade dos rebanhos bovinos aumentando-se o número de crias de uma vaca com grande potencial genético, multiplicando a possibilidade de se ter um rebanho de matrizes aptas a produzirem cada vez mais, num curto espaço de tempo, isto é, uma vaca que em toda vida útil teria em média de 4 a 5 crias, produziria com transferência de embriões em torno de 30 a 40 crias.

O estabelecimento da atividade cíclica ovariana na puberdade é importante para a formação e liberação dos gametas, assim como para que ocorra a maturidade sexual (STANBENFELDT & EDQVIST, 1996).

Estando a transferência de embriões em consolidação no Brasil, apresenta-se como um de seus principais objetivos maximizar o potencial reprodutivo da fêmea, explorando seu potencial biológico ao extrapolar suas possibilidades naturais.

A TE é uma biotécnica que permite recolher embriões de uma fêmea doadora e transferi-los para fêmeas receptoras com a finalidade de complementarem o período de gestação (REICHENBACH et al., 2002).

A principal meta do programa de transferência de embriões é a superovulação, obtendo-se o número alto e satisfatório de embriões viáveis por doadora, através do aumento do número de oocistos liberados após administração de hormônios exógenos, e posterior transferência dos

embriões obtidos para o trato reprodutivo de receptoras para completarem a gestação (RUMPF, et al., 2000).

A TE consiste na estimulação hormonal do aparelho reprodutivo de uma fêmea, dita doadora para conduzir o desenvolvimento e a maturação de vários folículos ovarianos simultaneamente. Entre os dias 6 a 8 após a inseminação artificial (IA), os embriões são coletados através de uma lavagem uterina e transferidos para vacas, ditas receptoras, que levarão a gestação a termo.

A importância básica da TE para a produção animal consiste na possibilidade de uma fêmea produzir um número de descendentes muito superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva (REICHENBACH et al., 2002).

Para a produção animal, os aspectos mais importantes da TE são os seguintes:

- Expansão genética em núcleos de vacas pré-selecionadas;
- Aumento da intensidade de seleção nas fêmeas;
- Comercio de embriões;
- Criopreservação de raças em perigo de extinção pela criopreservação.

Diversos fatores podem influenciar os resultados no momento da TE, como manejo, estado nutricional e sanidade, tanto das doadoras quanto das receptoras, taxa de ovulação das doadoras, condição de como os embriões estão sendo transferidos (fresco ou criopreservado), idade dos embriões, sincronia entre doadora e receptora, método de colheita. Experiência da equipe responsável pela morfologia dos embriões, levando também em consideração o número de CL das receptoras.

Segundo Alberio (2001), a seleção e manejo das doadoras são um dos pontos críticos da TE, haja vista a obrigatoriedade de utilizar animais sem distúrbios reprodutivos, com ciclo estral regular e em adequado estado nutricional, sendo que estas fêmeas não estando reprodutivamente sadias e com um adequado escore de condição corporal, o programa pode fracassar.

Novilhas púberes devem ser incluídas num programa de TE, desde que tenham adquirido massa muscular representativa de seu peso adulto e apresentem desenvolvimento anátomo-fisiológico que permita a realização dos procedimentos necessários para a colheita de embriões (REICHENBACH et al., 2002).

Do ponto de vista reprodutivo, uma boa receptora é a fêmea capaz de receber um embrião e levá-lo a término. Esta deve ser capaz de parir sem grandes dificuldades e alimentar o bezerro de maneira que lhe permita expressar seu potencial genético (ALBERIO, 2001). Já Reichenbach et al. (2002), as receptoras constituem uma parte fundamental de um programa de TE porque necessitam conceber e levar a gestação a termo. A aquisição desses animais é de custo elevado, a manutenção é dispendiosa e o estado de saúde é crítico para o êxito da TE. A receptora deve ter um porte compatível com a raça do embrião a ser transferido para garantir uma gestação normal e um parto livre de auxílio obstétrico, bem como capaz de produzir leite suficiente para amamentar e permitir que a cria desenvolva normalmente.

2.1 PREPARAÇÃO DAS DOADORAS

A preparação das vacas doadoras consisti na aplicação de anestesia epidural baixa, para obter um bom relaxamento do reto e evitar contrações uterinas. A perfeita higienização da região perineal e o esvaziamento do reto devem ser realizados para diminuir a possibilidade de contaminação do catete e conseqüentemente o embrião.

Outro cuidado é de se evitar a entrada de ar no reto no momento da coleta, isso porque dificulta o procedimento. A vulva e a região que rodeia são lavadas e secadas.

2.2 POSIÇÃO DA SONDA DE FOLEY E LAVAGEM UTERINA

Antes de introduzir a sonda, esta deve ser enxaguada com solução de lavagem uterina (PBS). Isto ajuda a lubrificar e eliminar as impurezas que poderiam ficar retidas depois da esterilização com óxido de etileno, que

possui ação embriotóxica. Depois do enxágüe, é feita a montagem da sonda, com a introdução do mandril no seu interior para diminuir sua flexibilidade e aumentar sua resistência. Na extremidade posterior da sonda, coloca um pedaço de papel alumínio, com a finalidade de impedir a entrada de impurezas no seu interior. Depois de realizados estes procedimentos, a sonda é introduzida na vulva. Depois de transpassada a cérvix, é feita a retirada do mandril e inflado o balão da sonda com uma seringa de 20ml contendo água ou ar, dando este um volume de aproximadamente 3 a 5ml, ocorrendo assim a obstrução da cérvix e deixando livre somente a luz interior da sonda. Após inflado o balão, é feito o encaixe do tubo "Y" de PVC, juntamente ao filtro e a bolsa de lavagem (Figura 1).



FIGURA 1: Lavagem uterina para colheita dos embriões

Fonte: Apil Agropecuária LTDA

A bolsa de lavagem deve permanecer a uma temperatura de 37⁰C até o momento da coleta. A lavagem é realizada com pequenos volumes de DPBS em quantidade que preencha toda luz uterina. O líquido oriundo da lavagem passa pelo filtro, ficando retidos somente as estruturas

recuperadas (Figura 2). Encerrada a lavagem, o filtro segue para o laboratório onde sofre uma lavagem com DPBS e a busca de embriões.



FIGURA 2: Líquido oriundo da lavagem uterina passando pelo filtro onde fica retido o embrião.
Fonte: Apil Agropecuária LTDA

2.3 OBTENÇÃO E BUSCA DOS EMBRIÕES

A lavagem do filtro é feita com seringas de 20ml cada contendo DPBS, fazendo uma pressão sobre o êmbolo e lavando as paredes e o fundo deste com jatos.

O líquido oriundo da lavagem do filtro é armazenado em uma placa de Petri, onde sofre o processo de decantação para posterior procura na lupa etereomicroscópica. As estruturas encontradas são depositadas em outra placa de Petri de menor diâmetro com meio de manutenção (PBS + 0,4% de BSA¹¹) para posterior avaliações.

¹¹ HOLDING Embriocare

2.4 EVOLUÇÃO MORFOLÓGICA

A evolução morfológica dos embriões é um dos passos mais importantes para o sucesso do programa de transferência de embriões. Determinar a transferência de um embrião exclusivamente através de suas qualidades morfológicas é, no entanto, um equívoco. Outros fatores como o valor do embrião em particular e também a disponibilidade de receptoras é de importância na decisão.

É conveniente acentuar que uma rigorosa seleção dos embriões por meio de sua evolução morfológica aumenta a taxa de gestações por transferência, e ao mesmo tempo, diminui a taxa de prenhes por cada doadora. A idade do embrião é estabelecida a partir do dia do estro (dia 0). O dia 1 corresponde a ovulação.

São utilizados cinco estágios de desenvolvimento: estágio 1 (mórula: aglomerado celular em cuja superfície blastômeros individuais podem ser distinguidos); estágio 2 (mórula compacta: blastômeros individuais não podem ser distinguidos na superfície do embrião); estágio 3 (blastocisto inicial: uma pequena cavidade, a blastocele, está visível e a massa celular interna começa a se formar); estágio 4 (blastocisto: o embrião ocupa a maior parte dentro da zona pelúcida, a massa celular interna começa a tornar-se mais distinta mas o diâmetro global do embrião, incluindo a zona pelúcida, permanece inalterado); e estágio 5 (blastocisto expandido: o diâmetro embrionário está aumentado e a espessura da zona pelúcida pode ser reduzida para aproximadamente 1/3 da espessura original).

Quanto à qualidade, os embriões serão classificados em quatro graus: grau I (excelente: estágio de desenvolvimento com zona pelúcida intacta e esférica, massa celular homogênea com células de tamanho uniforme, nenhum ou poucos fragmentos celulares no espaço perivitelino); grau II (bom: alterações mínimas na forma e coloração com relação ao grau I, alguns fragmentos ou debris celulares no espaço perivitelino e/ou pequenas formações vesiculares nos blastômeros); grau III (regular: claras alterações comparadas com o grau II, embora com a maior parte da massa celular intacta); e grau IV (ruim: muitos fragmentos ou debris celulares no espaço perivitelino, vesículas maiores e em maior número e claras

mudanças degenerativas nos blastômeros, com menos da metade da massa celular intacta).

2.4.1 CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

A avaliação morfológica (figura 3) de um embrião considera-se os seguintes critérios sobre as estruturas e qualidades de um embrião de excelente qualidade:

- Forma esferóide;
- Simetria dos blastômeros;
- Aparência clara e nítida dos blastômeros;
- Tonalidade escura e uniforme;
- Uniformidade da membrana celular;
- Proporcionalidade entre o embrião e o espaço perivitelíneo;
- Integridade da zona pelúcia;
- Ausência de vacúolo no embrião e fragmentos celulares no espaço perivitelíneo;
- Ausência de fragmentos celulares aderidos à zona pelúcida;
- Compactação dos blastômeros entre si.



FIGURA 3: Avaliação morfológica dos embriões
Fonte: Apil agropecuária LTDA

3. INOVULAÇÃO

Os embriões encontrados na placa de Petri, avaliados morfológicamente e que foram designados viáveis podem ser congelados ou inovulados em receptoras. Para transferência a fresco, o embrião deve sofrer três banhos consecutivos com meio de manutenção (PBS + 0,4% de BSA¹²) para lavagem. Após os banhos o embrião é envasado em palhetas de 0,25 ml. A palheta é carregada em primeiro lugar com o meio de manutenção, deixa um espaço com ar e logo se carrega o embrião com meio de manutenção. Posteriormente, a segunda coluna de ar e a última novamente com o meio.

A palheta que contem o embrião é colocada em uma bainha estéril e em seguida no inovulador. Para manter a bainha do inovulador livre de contaminações, deve ser usada a camisinha sanitária (Figura 4).

¹² **HOLDING** Embriocare



FIGURA 4: Inovulação embrionária em uma vaca receptora

Fonte: Apil agropecuária LTDA

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em vista das diversas biotecnologias desenvolvidas na área de reprodução animal, a transferência de embriões trouxe um incremento para a produção animal. Sendo mais de 50 anos de implantação e melhoramento da técnica de transferência de embriões, e havendo neste período muitos avanços. Além disso, é uma técnica dispendiosa que somente permite a produção de crias geneticamente privilegiadas e com alto valor de mercado.

Os protocolos para superovulação ainda não são perfeitos, os resultados são estáveis dentro de diferentes raças e idade das doadoras. Os protocolos devem ser adequados na sua individualidade de cada animal para obtenção de respostas cada vez melhores.

Na técnica de colheita de embriões, o método não cirúrgico é fácil e sem riscos a doadora, quando realizado por um veterinário capacitado a realização deste procedimento.

A classificação de embriões deve ser realizada criteriosamente para garantir boas taxas de concepção, e com isso aumentar a eficiência reprodutiva, melhorando e multiplicando a sua genética dentro do rebanho.

A indução da emergência de uma nova onda de crescimento folicular permitiu a IATF e dispensou a observação de cio, da doadora, tanto antes como após a superovulação.

5 REFERÊNCIAS

ALBERTO, R.H.; Manejo de doadoras e receptoras In: PALMA, G.A., **Biotecnología de la reproducción**. 1ª edição editora INTA, Argentina, 2001. p.21-26

ALVAREZ, R.H.; CARVALHO, J.B.P; SILVA, A.R.; PERONE, C.N.; RIBELA, M.T.C.P.; OLIVEIRA FILHO, E.B. Endocrine profiles and ovulation rate of cows superovulated with FSH following passive immunization against steroid free-bovine follicular fluid. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* [on line]. 1998, vol.35, nº 6 [cited 15 November 2004], p. 00-00. Available from World Wide Web: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95961998000600007&lng=en&nrm=iso ISSN 1413-9596.

ANDRADE, J.C.O.; OLIVEIRA, M.A.L.; SANTOS FILHO, A.S.; WISCHRAL, A.; LIMA, P.F.; SOUZA, D.M.B. Diferentes protocolos de superovulação em vacas Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v. 23, n.3, p. 317-18, 1999.

BALIEIRO, E.S.; PEREIRA, J.C.C.; VERNEQUE, R.S.; PEREIRA, C.S.; BERGMANN, J.A.G. Estimativas de parâmetros genéticos e de tendência fenotípica, genética e de ambiente de algumas características reprodutivas na raça Gir. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* [online]. Ago. 1999, vol. 51, nº 4 [citado 13 Novembro 2004], p. 371-376. Disponível na World Wide Web: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09351999000400014&lng=pt&nrm=iso. ISSN 0102-0935.

BENYEI, B.; BARROS, C.C.W. Effect of superovulation on performance of bovine embryo donors imported from temperate zone to tropical climate during the first two years of adaptation. **Arq. Bras. Med. Zootec.**, Aug. 2000, vol. 52, nº 4, p. 366-371. ISSN 0102-0935.

BÓ, G.A. Sincronización Del desarrollo folicular y luteal in grupos de donantes y receptoras de embriones bovinos. In: **II Curso de abordagem teórico-prática de novas técnicas de sincronização sem observação de cio em bovinos (IA e TE)**. Cornélio Procópio-PR. Anais, 2002.

BORGES, Á.M., TORRES, C.A.A., RUAS, J.R.M., ROCHA JÚNIOR, V.R., CARVALHO, G.R. Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** , out. 2001, vol.53, nº5, p. 595-604. ISSN 01102-0935.

CABODEVILA, J. & TORQUATRI, S. Superovulação de Fêmeas bovinas. In: PALMA, G.A. **Biotecnología de la reproducción** 1ª edição INTA, Argentina, 2001. p. 79-108

CARDELLINO, R.A.; OSÓRIO, J.C.S. **MELHORAMENTO ANIMAL** 1ªed Pelotas, Ed. Universitária, 1999 p. 54-59.

COSTA, L.L.; SILVA, J.C.; SILVA, J.R. Superovulatory response embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. **Theriogenology** v. 56, n.1, p. 65-77, 2001.

DINIZ, E.G.; JACOMINI, J.O.; NASCIMENTO, M.R.B.M.; MENDES JR, J.O.B.; ESPER, C.R.. Eficiência de dois diferentes produtos hormonais na superovulação de vacas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v. 23, n.3, p. 319-20, 1999.

FONSECA, J.F.; SILVA FILHO, J.M.; PINTO NETO, A.; PALHARES, M.S. Superovulated zebu cows embryonic developmental stages. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Dec. 2001, vol. 53, nº 6, p. 671-676. ISSN 0102-0935

JAINUDEEN, M.R.; WAHID, H.; HAFEZ, E.S.E.. Indução da Ovulação, Produção e Transferência de Embriões. In: Hafez, E.S.E; Hafez, B.. **REPRODUÇÃO ANIMAL**, 7ªed. Barueri, Ed. Manole, 2004. p.413-419.

KANAGAWA, H.; SHIMOHIRA, I.; SAITOH, N. **Manual of bovine embryo transfer**. 1º edição Japan Livestock Technology Association, 1995. 432p.

MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. . Recent advances in the superovulation in cattle. **Reprod. Nutr. Dev.** v.42, p. 601-611, 2002.

MOREIRA, R.J.C. Uso do protocolo CRESTAR® em tratamentos utilizando benzoato de estradiol, PGF_{2a}, PMSG e GnRH para controle do ciclo estral e ovulação em vacas de corte. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2002. 1-62p. Dissertação (Mestrado).

NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C.; MACIEL, M.N.. Eficiência Reprodutiva em Gado Leiteiro. In: Galina, C.; Pimentel, C.A.; Neves, J.P.; Moraes, J.C.F.; Henkes, L.E.; Gonçalves, P.B.; Weiner, T. **AVANÇOS NA REPRODUÇÃO BOVINA 2000**, 1ªed. Pelotas, Ed. Universitária, 2000 p.35-37.

RAMOS, A.A., CAMARGO, L.S.A., SÁ, W.F., FERREIRA, A.M., COSTA, E.P. In vitro fertilization with bovine sêmen in Gyr breed. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** [online]. Aug. 2000, vol.52, nº. 4 [cited 13 November 2004], p. 360-365. Available from World Wide Web: http://www.scielo.br/scielo.phd?script=sci_arttext&pid=S0102-09352000000400013&lng=en&nrm=iso. ISSN 0102-0935.

REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: Gonsalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. **BIOTÉCNICAS APLICADAS À REPRODUÇÃO ANIMAL**, 1ªed. São Paulo, Ed. Varela, 2002 p.153-160.

RUMPF, R.; BEM, D.E.; PEIXER, M.A.S.; SOUZA, R.V. **Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e eqüina**. Brasília: EMBRAPA – Recursos genéticos e biotecnologia, 2000, p. 71-103.

STABENFELDT, H.G.; EDQVIST, E.L. Processos reprodutivos na fêmea. In: Swenson, j.m.; Reece, o.w. **Fisiologia dos animais domésticos** 11^o edição Rio de Janeiro, 1996, p. 615-616.

THACHER, W.W.; MOREIRA, F.; SANTOS, J.E.P.; MATTOS, R.C.; LOPES, F.L.; PANCARCI, S.M.; RISCO, C.A.. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology** v. 55, n.1, p. 75-89, 2001.

VISINTIN, J.A.; ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H.; MIZUTA, K.; CELEGHINI, E.C.C.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; GUSMÕES, P.P.G.; CANDINI, P.H. Superovulação de novilhas da raça Nelore com diferentes doses de FSH/LH e congelação de embriões pelo método one-step com etilenoglicol. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* [online]. 1999, vol.36, n^o 5 [citado 13 de Novembro 2004], p.00-00. Disponível na World Wide Web: http://www.scielo.br.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95961999000500009&lng=pt&nrm=iso. ISSN 1413-9596.

WOLFENSON, D.; SONEGO, H.; SHAHAM-ALBALANCY, A.; SHPIRER, Y.; MEIDAN, R. Comparison of the steroidogenic capacity of bovine follicular and luteal cells, and corpora lutea originating from dominant follicles of the first or second follicular wave. **Journal of Reproduction and Fertility** v. 117, n.2, p. 241-246, 1999.