

Gustavo Valente Ramos Brandão

**REVISÃO DE LITERATURA: TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM
BOVINOS**

Curitibanos - SC

2019



Gustavo Valente Ramos Brandão

Revisão de literatura: Transferência de Embriões em bovinos

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Ciências Rurais, Campus de Curitiba, da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Medicina Veterinária.
Orientador: Prof. Dr. Marcos Henrique Barreta

Curitiba - SC

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Valente Ramos Brandão, Gustavo
Revisão de Literatura: Transferência de Embrião
em Bovinos / Gustavo Valente Ramos Brandão ;
orientador, Marcos Henrique Barreta, 2019.
46 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, , Graduação
em , Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. . 2. Transferência de Embrião. 3. Bovinos. I.
Barreta, Marcos Henrique . II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Graduação em . III. Título.

Gustavo Valente Ramos Brandão

Revisão de literatura: Transferência de Embriões em Bovinos

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Medicina Veterinária”.

Curitiba, 09 de Julho de 2019.

Prof. Dr. Alexandre de Oliveira Tavela
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Henrique Barreta
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

M.V. André Lucio Fontana Goetten
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Giuliano Moraes Figueiró
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico aos meus pais, familiares, minha parceira Maria Laura e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, por todo apoio e dedicação para que meus sonhos se tornassem realidade.

Ao meu avô Telmo, por todo incentivo e apoio para concretizar um sonho.

A Maria Laura, por ser um dos alicerces para a conclusão de diversos sonhos, por todo apoio, dedicação e paciência. Por enfrentar junto comigo vários desafios.

A Valéria, por ser ponto de escape nos momentos complicados.

A minha madrinha Guega, por ser minha segunda mãe e sempre me incentivar com os novos desafios.

Ao meu avô Antonio Brandão, por ser exemplo na minha formação.

Ao meu padrinho Paulo Brandão, por me incentivar a enfrentar os desafios mais complicados.

A todos os professores que me acompanharam durante a graduação. Em especial aos professores Marcos Barreta, Valério Portela, Giuliano Figueiró, Alexandre Tavela e Malcom Martinez.

Ao grande amigo André Goetten, por todo suporte para tomada de diversas decisões durante a graduação.

Aos meus familiares que, de certa forma, influenciaram para a conclusão de um sonho. Em especial ao Carlos Ramos e Flavio Ramos, por serem exemplos de profissionais.

Aos meus amigos, por toda parceria e união durante toda a graduação. Em especial ao Fabio Oliveira, João Emanuel e Alan Berlanda.

A toda a equipe da UF, por toda troca de conhecimento e pela recepção para o estágio. Em especial ao Dr Rafael Bisinotto, Caio Figueiredo, Sebastina Sedó, Victoria Santos e Thiago Vellar.

E de modo geral a todos que tiveram influência em minha vida.

”Para conseguir o que quer, você deve olhar além do que você vê”.
- O Rei Leão (1994).

RESUMO

A Transferência de embriões em bovinos é uma biotecnologia muito importante para realizar um ganho genético em um espaço de tempo reduzido. A busca por melhores índices na aplicação da técnica é dependente de diversos fatores, tanto individuais como de manipulação pelo responsável. Para uma boa aplicação da técnica se faz necessário manipular a fisiologia reprodutiva visando uma superovulação de uma doadora para disseminar sua genética. O presente trabalho, para conclusão de curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina, apresenta uma revisão bibliográfica sobre transferência de embriões (TE) em bovinos. O texto apresenta dados atuais da técnica, fisiologia reprodutiva bovina, pontos cruciais da TE, hormônios relacionados para aplicação da técnica, exemplos de protocolos de superovulação de doadoras e protocolos de sincronização de receptoras. O texto descreve a técnica de transferência, além de pontuar os pontos cruciais para obter êxito na sua aplicação.

Palavras-chave: Transferência de embrião. Superovulação. Bovinos.

ABSTRACT

Embryo Transfer in cattle is a very important biotechnology to achieve a genetic gain in a short time, the search for better indexes in the application of the technique is dependent on several factors, both individual and manipulation by the responsible. For a good application of the technique it is necessary to manipulate the reproductive physiology aiming at a superovulation of a donor to disseminate genetics. The present work to conclude the course of veterinary Medicine of the Universidade Federal de Santa Catarina, was carried out a bibliographic review on Embryo Transfer (TE) in cattle. The text covers a review, presenting the current data of the technique, bovine reproductive physiology, crucial points of the TE, related hormones of synchronization of Receiving. The text describes the transfer technique, and punctuate the crucial points to succeed in your application.

Keywords: Embryo Transfer. Superovulation. Cattle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Cenário de embriões bovinos.	17
Figura 2 - Controle da Fisiologia Reprodutiva da fêmea Bovina.	20
Figura 3 – Padrão de crescimento folicular e formação de corpo lúteo.	21
Figura 4– Ilustração da forma de aumento e disseminação genética da TE.	24
Figura 5– Ilustração da ação hormonal sob efeitos de protocolos de superovulação em bovinos fêmeas.	26
Figura 6 – Sonda de Foley.	31
Figura 7 – Ilustração de transposição cervical de sonda Foley para lavado uterino e coleta de embriões.	32
Figura 8 – Mandril.	32
Figura 9 – Filtro coletor de embriões.	33
Figura 10 – Ilustração de embriões bovinos produzidos in vivo de acordo com o estágio de desenvolvimento.	35
Figura 11 – Palhetas com embrião.	36
Figura 12 – Esquema ilustrativo de envase de palheta com embrião.	36
Figura 13 – Protocolo com uso de progesterona, benzoato de estradiol e gonadotrofina coriônica equina.	38
Figura 14 – Protocolo OVYSYNCH de sincronização da ovulação de receptoras.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Produção de embriões bovinos no Brasil, 2017.	16
Tabela 2 - Síntese dos hormônios envolvidos na reprodução, com suas respectivas fontes e funções.	19
Tabela 3 - Protocolo hormonal de superovulação tendo base cio natural.	27
Tabela 4 - Protocolo hormonal de superovulação tendo base cio natural associado com GnRH/LH para Inseminação Artificial em tempo fixo.	27
Tabela 5 - Protocolo de superovulação e inseminação em tempo fixo para doadoras taurinas.	28
Tabela 6 - Protocolo de superovulação e inseminação em tempo fixo para doadoras zebuínas.	28
Tabela 7 - Resultados encontrados após a colheita de embriões nas doadoras bovinas sob diferentes dosagens de tratamentos com suplementação exógena de FSH.	29
Tabela 8 – Protocolo para superovulação de fêmeas bovinas utilizando doses decrescente de FSH exógena.	30
Tabela 9 – Valores considerados no cenário-base em uma fazenda.	39
Tabela 10 – Custo de manutenção médio/mês/animal.	39
Tabela 11– Valores referentes ao material de consumo.	40
Tabela 12 – Valores médios referentes aos custos de produção de embriões.	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IA - Inseminação Artificial.

BE – Benzoato de estradiol.

CE – Cipionato de estradiol.

CL – Corpo lúteo.

eCG - Gonadotrofina coriônica equina.

FSH – Hormônio folículo estimulante.

GnRH - Hormônio liberador das gonadotrofinas.

hCG – Gonadotrofina coriônica humana.

IGF – Fator de crescimento semelhante a insulina.

LH – Hormônio luteinizante.

P4 – Progesterona.

PGF2 α – Prostaglandina.

TE - Transferência de embrião.

UF – University of Florida

Sumário

1	Introdução	13
2	Desenvolvimento.....	16
2.1	Aspectos atuais da TE no Brasil	16
2.2	Fisiologia Reprodutiva	17
3	Transferência de Embriões	23
3.1	Necessidades da Transferência de Embrião	24
3.1.1	Seleção e Manejo de Doadoras.....	25
3.1.2	Superovulação	25
3.2	Coleta dos embriões.....	30
3.2.1	Busca, avaliação e classificação dos embriões	33
4	Envase	35
5	Estocagem dos embriões.....	36
6	Receptoras de embrião	36
7	Custos.....	38
8	Resultados esperados para TE.....	40
9	Fatores que podem interferir negativamente na TE	41
10	Considerações finais	41
	REFERÊNCIAS.....	42

1 Introdução

A primeira transferência de embrião (TE) em bovinos foi reportada no ano de 1949. Porém, o primeiro nascimento de um produto originário de transferência aconteceu somente no ano de 1951. Esta técnica teve uma evolução extremamente importante para a reprodução bovina em um âmbito mundial sendo uma ferramenta muito útil para a evolução genética dos rebanhos mundiais (SEIDEL JUNIOR; SEIDEL, 2005).

Sob uma visão nacional a pecuária brasileira vem passando constantemente por modificações e atualizações visando atender as demandas dos produtores e do mercado consumidor. Neste cenário, as biotécnicas aplicadas à reprodução devem ser consideradas de suma importância, como a principal forma de evolução genética e conseqüentemente melhora dos animais. A TE proporciona um número elevado de descendentes provenientes de um acasalamento quando comparado a monta natural ou inseminação artificial. Levando este fator em consideração, pode-se afirmar que a técnica possibilita uma evolução no sistema de produção em um período de tempo mais curto, geração de escalas industriais e otimização de recursos e aumento de lucros diante de uma cadeia produtiva (BARUSELLI et al., 2006).

A TE consiste em estimular, por meios de hormônios que atuam no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, a obtenção de ovulações múltiplas em sincronia de um animal considerado superior dentro de um determinado grupo, seguida de inseminação artificial para que no final do processo se obtenham vários embriões que serão transferidos para fêmeas bovinas receptoras ou criopreservados. Com a utilização desta técnica podemos obter de apenas uma fêmea doadora diversos embriões por ano, sem que o animal considerado doador tenha a necessidade de passar por uma gestação e parto (SANTOS, 2012).

Este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre transferência de embriões bovinos abordando as suas características, dificuldades, aspectos atuais, materiais necessários, manejos dos animais envolvidos, fisiologia reprodutiva entre outros fatores.

2 Desenvolvimento

2.1 Aspectos atuais da TE no Brasil

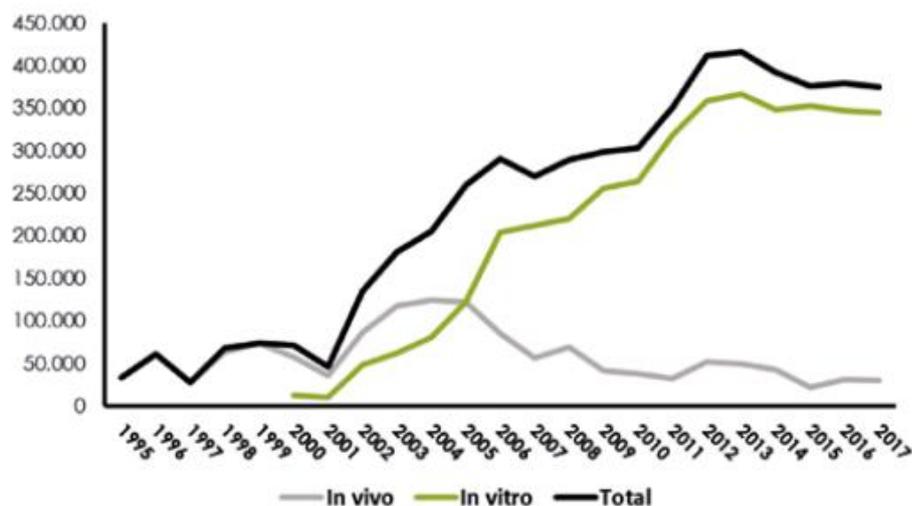
No ano de 2017 o rebanho bovino comercial atingiu números de aproximadamente 221 milhões de cabeças, composto por sua maioria de animais zebuínos. No intervalo do ano de 2016 a 2017 foram transferidos 29.975 embriões produzidos *in vivo*. De acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o país se encontra em 20º lugar no quesito de importação de genética por meio de embriões, porém dentro destes embriões se enquadram não somente os produzidos *in vivo* mas sim, somados aos produzidos *in vitro*. Os números atuais sobre a produção de embriões *in vivo* estão demonstrados na Tabela 1 e o histórico de produção dos últimos anos são ilustrados na Figura 1. O Brasil possui capacidade para aumentar estes números podendo ainda, exportar mais material genético, tendo como empecilho não somente barreiras sanitárias, mas sim barreiras políticas que acabam agravando o comércio internacional (OEMBRIÃO, 2018).

Tabela 1- Produção de embriões bovinos no Brasil, 2017.

Segmento	Embriões - <i>in vivo</i>
Zebuínos leiteiros	14
Taurinos leiteiros	22.371
Subtotal	22.385
Zebuínos de corte	1.300
Taurinos de corte	6.290
Subtotal	7.590
Total	29.975

Fonte: Adaptado de OEmbrião, 2018.

Figura 1- Cenário de embriões bovinos.



Fonte: OEmbrião, 2018.

2.2 Fisiologia Reprodutiva

O início do desenvolvimento do oócito bovino ocorre durante a fase fetal, proveniente das células germinativas primordiais do endoderma do saco vitelino. Estas células germinativas após diversas mitoses, seguidas sínteses de DNA e início da meiose atingem uma fase denominada de oócitos primários que adquirem uma camada única de células achatadas (pré-granulosa) formando enfim, um folículo primordial. Estes folículos primordiais permanecem em repouso até que ocorra um estímulo ao desenvolvimento, tornando as células achatadas da granulosa em células cuboides, mas continuando somente em uma única camada, sendo assim denominados de folículos primários. A partir de uma multiplicação das células da granulosa com aumento de suas camadas celulares e a junção inicial de material na zona pelúcida contornando o oócito, caracteriza-se uma passagem de folículo primário para folículo secundário. Seguindo o processo, ocorre uma proliferação e diferenciação de células que estão circundando o oócito em células da teca interna e externa, somando a este processo a formação de uma cavidade antral com fluído, conhecida como fluído folicular e assim caracterizando o folículo antral inicial. Após este processo de evolução e maturação do folículo, alguns mecanismos endócrinos passam a atuar na regulação do desenvolvimento folicular, tendo como exemplo: hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), hormônio foliculo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estradiol e progesterona (SANTOS, 2017).

O GnRH é produzido pelo hipotálamo, que é uma estrutura pequena localizada na base do cérebro, e atua diretamente sobre a adeno-hipófise produzindo hormônios proteicos que são extremamente importantes, sendo eles denominados gonadotrofinas (LH e FSH). Estes hormônios são sinérgicos no desenvolvimento folicular ovariano e no processo de ovulação, atuando o FSH sob o desenvolvimento e maturação folicular e o LH atuará diretamente na dominância folicular para uma posterior ovulação. Os hormônios estradiol e P4 são produzidos por ovários e corpo lúteo (CL) respectivamente, onde estão diretamente correlacionados com a manifestação de cio no caso do estrógeno e na manutenção da gestação no caso da progesterona (P4) (CUNNINGHAM, 2001).

2.2.1 Ciclo estral bovino

O ciclo estral dos bovinos pode ser dividido em fases distintas, sendo elas a fase folicular e a fase luteal. Na fase folicular é onde ocorre o desenvolvimento do folículo até o momento da liberação do oócito através da ovulação e esta fase pode ser dividida em proestro e estro. O período de proestro é o momento que antecede o estro propriamente dito, tendo sua duração de aproximadamente dois a três dias e sua principal característica é a redução dos níveis plasmáticos de progesterona e o aumento dos níveis plasmáticos de estrógeno. Nesta fase ocorre um aumento da secreção de GnRH, estímulo ao desenvolvimento e maturação folicular. O folículo dominante em desenvolvimento produz quantidade crescente de estradiol e o comportamento de estro é manifestado pelo animal quando o estradiol atinge seu pico de produção. Durante o estro o animal manifesta comportamentos típicos deste estágio do ciclo, tais como: inquietação, aceitação da monta por outros animais do rebanho, movimentação de perseguição a outros bovinos, descarga de muco cristalino pela vulva, diminuição da ingestão de alimento e redução na produção de leite.

Após o término do estro se inicia a fase luteal, a qual, pode ser dividida em metaestro e diestro. O metaestro tem duração de aproximadamente dois a três dias e é caracterizado principalmente por ser o período entre a ovulação e a formação do CL no local do folículo recém ovulado, sendo esta estrutura a responsável pela produção de progesterona e pela manutenção da gestação. No período em que o CL passa a ser funcional, em torno do dia 4 do ciclo, realizando a síntese e produção de altos níveis de progesterona temos então a fase de diestro, que dentre as fases do ciclo estral é a que possui maior período de duração em torno de 13 dias. Para a manutenção do CL no ovário é necessário haver fecundação e reconhecimento materno da gestação e assim, os níveis de progesterona se manterão elevados. Caso o

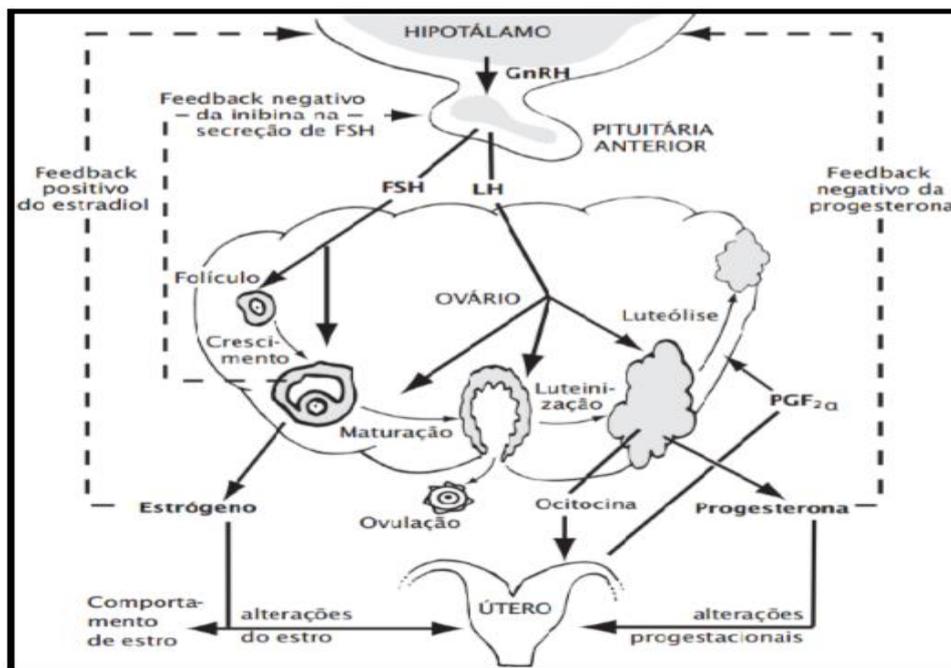
reconhecimento materno da gestação não ocorra o CL irá regredir por meio da ação de prostaglandina F2 alfa (PGF2 α) produzida pelo endométrio, conseqüentemente diminuindo os níveis de progesterona e permitindo assim o início de um novo ciclo estral e findando a fase de diestro (VALLE, 1991). A Tabela 2, traz um resumo dos hormônios envolvidos na reprodução, com suas respectivas fontes e funções, assim como a Figura 2, traz um esquema representativo da fisiologia reprodutiva de fêmea bovina.

Tabela 2 - Síntese dos hormônios envolvidos na reprodução, com suas respectivas fontes e funções.

Hormônio	Fonte	Função
GnRH	Hipotálamo	Produção FSH e LH e liberação de LH
FSH	Hipófise anterior	Estimula o recrutamento e desenvolvimento folicular e a secreção de estradiol
LH	Hipófise anterior	Estimula o crescimento final do folículo dominante, ovulação, formação e manutenção do corpo lúteo
Estradiol	Folículo (ovário)	Estimula a manifestação do cio e aumenta a pulsatilidade de GnRH/LH
Progesterona	Corpo lúteo-ovário	Manutenção da gestação
IGF 1 e 2	Ovário	Controle do processo de seleção de folículos antrais

Fonte: Adaptado de Santos (2012) e Magalhães (2012).

Figura 2 - Controle da Fisiologia Reprodutiva da fêmea Bovina.



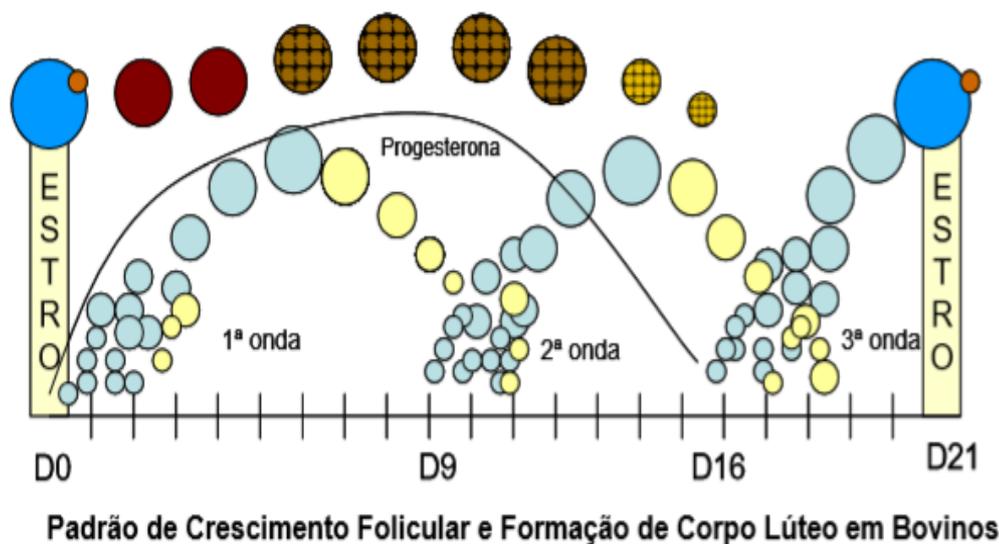
Fonte: Intervet Internacional, 2007.

Com relação a manifestação de estro ao longo do ano, a espécie bovina é caracterizada como poliéstrica anual, ou seja, ciclam durante o ano todo. O ciclo estral consiste de uma série de eventos reprodutivos que iniciam no estro e terminam no estro subsequente. Nos bovinos o intervalo entre estros tem uma duração média de 21 dias, mas podendo ter variação uma esperada de 17 a 25 dias. Esta periodicidade de manifestação estral pode ser interrompida em situações caracterizadas como anestro (FERRAZ et al., 2008).

Durante um ciclo estral ocorrem normalmente de duas a três ondas de crescimento folicular, sendo que, apenas a última onda folicular é a que proporciona uma ovulação e para que isso ocorra é necessário uma série de mudanças estruturais do folículo que dará origem a um CL. O CL possui alta capacidade de desenvolvimento e de produção de progesterona, entretanto, por volta do 15º ao 18º dia do ciclo, ocorre o processo de luteólise que leva a regressão do CL e a queda dos níveis séricos de progesterona. Cada onda folicular passa por um processo de seleção, recrutamento e dominância, onde o folículo que passe a ser dominante em uma determinada onda de crescimento terá dois possíveis destinos, na presença de altas concentrações de progesterona o folículo dominante entrará em atresia, mas caso após processo de luteólise o folículo dominante não passe pelo processo de atresia, chegará a uma ovulação. Não ocorrendo a fertilização do oócito ovulado, o ciclo estral iniciará novamente. O padrão de

crescimento folicular e formação do corpo lúteo é ilustrado na Figura 3 (BINELLI; TRENTINARO; BISINOTTO, 2006).

Figura 3 – Padrão de crescimento folicular e formação de corpo lúteo.



Fonte: Adaptado de Binelli et al., 2006.

O padrão de crescimento folicular antral é dividido primeiramente em crescimento lento com aproximadamente 30 dias de duração, iniciando com folículos de diâmetro médio de 30 μm que iniciam com a aquisição do antro e posteriormente o desenvolvimento até o estágio de pequenos folículos antrais. A segunda etapa de crescimento, a fase rápida, tem sua duração em torno de cinco a sete dias, sendo assim denominada de onda folicular. A onda de crescimento folicular possui algumas características como: emergência de um grupo de folículos com 2-3 mm de diâmetro, seleção folicular permitindo que apenas um folículo estabeleça dominância. A seleção folicular ocorre em folículos com aproximadamente 8 mm de diâmetro em animais *Bos taurus* e 6 mm em *Bos indicus* (OLIVEIRA; FERREIRA; MINGOTI, 2011).

O crescimento folicular pré-antral é controlado por mecanismos que regulam a ativação e conseqüentemente o desenvolvimento contínuo dos folículos primordiais, seu crescimento tem relação de dependência da interação entre o oócito e as células da granulosa e da secreção de fatores de crescimento e diferenciação, proteínas morfogenéticas ósseas, fator de crescimento fibroblástico básico, fator de crescimento epidermal, ativinas e inibinas. O crescimento folicular antral se torna dependente do controle gonadal a partir de 2 mm, onde cada onda folicular é precedida por um aumento transitório da secreção de FSH. Nos bovinos

a inibição ou o atraso da secreção de FSH pode acarretar diretamente no desenvolvimento folicular e emergência da onda de crescimento folicular subsequente. Em protocolos de superovulação a aplicação de FSH exógeno possibilita que um maior número de folículos passem pela fase de seleção e estabelecimento de dominância folicular, aumentando assim a quantidade de folículos viáveis para ovulação. Os efeitos das aplicações de FSH exógeno são considerados dose-dependentes e quando aplicados em baixas doses podem acarretar em codominância folicular de apenas dois folículos (OLIVEIRA; FERREIRA; MINGOTI, 2011).

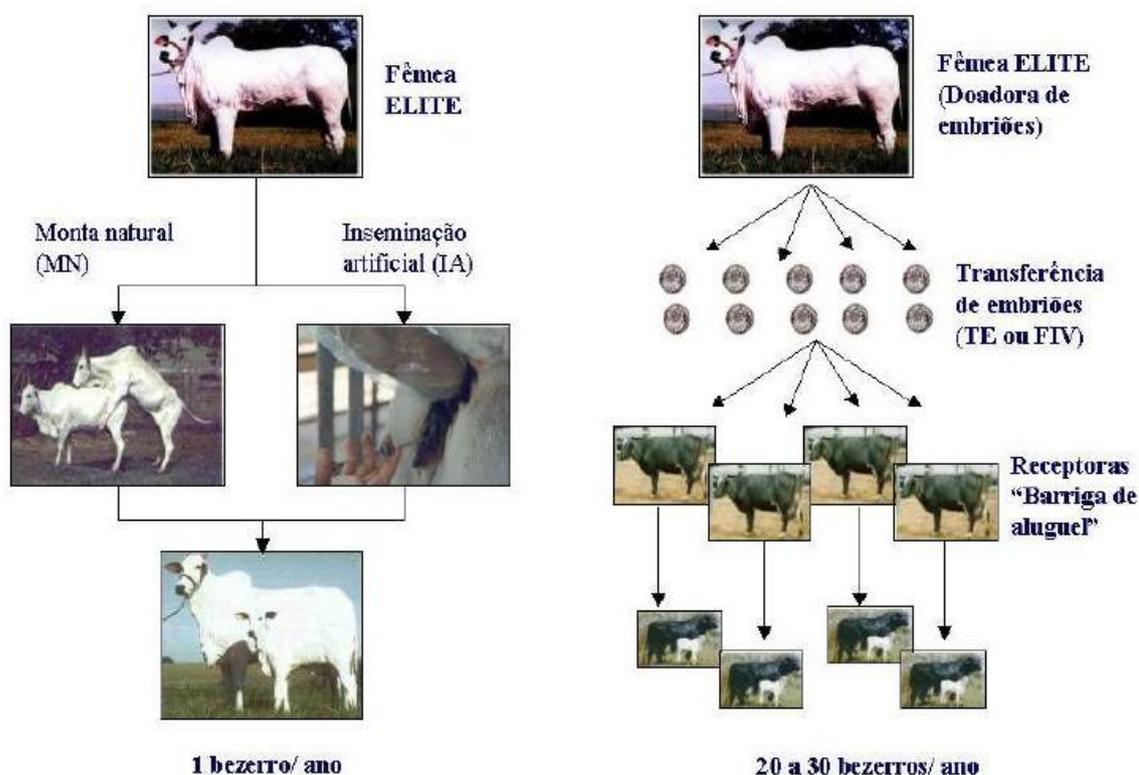
O processo pelo qual somente um folículo é escolhido é denominado de seleção folicular. Entretanto, o momento em que ocorre uma diferença nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos e interrupção do crescimento dos demais folículos é conhecido como divergência folicular. Quando o folículo de maior diâmetro estabelece sua dominância o mecanismo de divergência é bloqueado e o crescimento do segundo maior folículo cessa (MELLO et al., 2014). A seleção folicular pode ser caracterizada pelo crescimento do folículo até aproximadamente 6 a 8 mm de diâmetro em *Bos indicus* e *Bos taurus*, respectivamente. O futuro folículo dominante emerge aproximadamente cerca de seis ou sete horas antes do maior folículo subordinado, após a emergência os folículos entram em crescimento comum, tendo média de sete a onze folículos. O fato de o folículo futuramente dominante iniciar sua emergência antes dos demais resulta em uma vantagem de tamanho para se tornar folículo dominante ao final da fase de crescimento comum, e ao comparar aos demais folículos que iniciaram sua emergência mais tardiamente irão alcançar menor diâmetro máximo ao final da onda. A seleção folicular ocorre ao término da fase de crescimento comum dos folículos, quando o folículo de maior diâmetro cresce de forma contínua sob influência de fatores de crescimento (IGF) aumentando a proliferação de células da granulosa, a esteroidogênese e a expressão de receptores de FSH, enquanto que, os folículos subordinados reduzem sua taxa de crescimento e acabam regredindo em virtude da redução das concentrações séricas de FSH. Estas alterações de crescimento entre folículo dominante e subordinados é descrita como divergência morfológica. Outro fator sugerido como mecanismo chave na seleção folicular é a resposta a secreção de FSH após a emergência de uma onda folicular, sendo que todos os folículos recrutados parecem contribuir para que ocorra o declínio inicial do FSH periférico, sendo que o folículo com maior diâmetro possui o papel principal na redução de concentração de FSH a níveis inferiores, para dar continuidade de crescimento da população dos folículos com menor diâmetro dentro da onda (OLIVEIRA; FERREIRA; MINGOTI, 2011).

3 Transferência de Embriões

A Transferência de embriões (TE) é considerada uma biotécnica aplicada a reprodução que visa coletar embriões de uma fêmea doadora e transferir os mesmos para vacas que tenham capacidade de receber e passar por todo o período de gestação, parto, amamentação até o momento do desmame do produto. A sua importância se dá pela capacidade de uma única doadora produzir um número muito superior de descendentes do que quando comparado com a sua capacidade fisiológica natural de desenvolvimento de uma gestação (Figura 4). A TE permite que os plantéis recebam a inserção de material genético com elevado valor zootécnico (PEREIRA, 2012).

A TE possibilita que algumas genéticas entrem em países que não somente o de origem das doadoras, com isso, os embriões implantados nas receptoras nos países de destinação possibilitam que ao nascimento os animais consigam se adaptar prontamente as condições locais, do que quando transportados como animais mais velhos. Outro ponto importante sobre a TE se refere ao fato de que, com a utilização desta técnica, é possível a introdução de novas raças em locais que não existam exemplares (BALL; PETERS, 2006).

Figura 4– Ilustração da forma de aumento e disseminação genética da TE.



Fonte: Santos, 2012.

3.1 Necessidades da Transferência de Embrião

Para a execução da técnica de forma adequada se torna necessário que a propriedade tenha uma estrutura mínima que proporcione segurança tanto para os animais quanto para os responsáveis pela execução do procedimento. O básico de estrutura seria um curral em boas condições, um laboratório para manipulação dos embriões ou sala limpa para que seja montado um laboratório provisório, um bom tronco de contenção e disponibilidade de funcionários para realizar os trabalhos com os animais. Um manejo sanitário adequado englobando exames de brucelose e tuberculose negativos e vacinações em dia, endo/ectoparasitas controlados (SANTOS, 2012).

3.1.1 Seleção e Manejo de Doadoras

A seleção de um animal como potencial doador deve passar por uma avaliação com diversos pontos dentre eles:

1. Pedigree com boas linhagens
2. Premiação e méritos próprios ou de sua linhagem
3. Produção (carne ou leite)
4. Méritos de seus descendentes
5. Fenótipo

Ao se definir a doadora, alguns cuidados e procedimentos devem ser realizados antes de se iniciar qualquer passo. Dentre estes cuidados deve-se realizar uma análise de estado corporal, onde as doadoras devem estar sadias e com bom escore corporal, em uma escala de 1 – 5 o ideal seria em torno de 3, evitando animais em extremos. O exame ginecológico é de suma importância, sendo que as doadoras não devem estar gestantes e com um período de pós-parto de pelo menos 45 dias com ciclicidade normal, ausência de infecções e histórico de problemas reprodutivos (SANTOS, 2012).

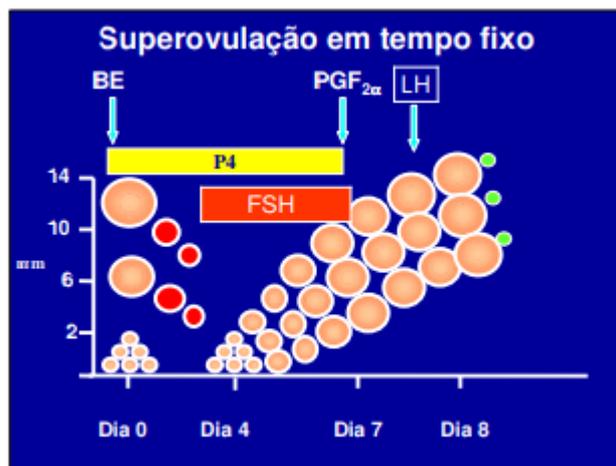
3.1.2 Superovulação

Na tentativa de realizar um aproveitamento melhor de um animal considerado superior e conseqüentemente maximizar a sua prole em um período de tempo reduzido, torna-se viável a questão de superovular uma vaca doadora e posteriormente a esta superovulação e inseminação, uma coleta de embriões por meio de lavagem uterina. A superovulação é realizada através da administração exógena de FSH, para se sobrepor os estímulos fisiológicos que desencadeiam uma única ovulação (SANTOS, 2012).

Através da administração dos hormônios exógenos para a superovulação, ocorrerá o desenvolvimento de diversos folículos com capacidade de ovulação, estes folículos pertencem a uma onda de desenvolvimento que em um ciclo normal sem a aplicação de FSH exógeno, entrariam em atresia. Com a suplementação hormonal fornecemos a diversos folículos a capacidade de ovular (Figura 5), não gerando assim um desgaste reprodutivo da doadora. Dentro dos protocolos de superovulação existe uma variação individual de resposta aos

tratamentos, sendo este um dos pontos críticos no contexto da TE (MARTINEZ; SOUZA, 2007).

Figura 5– Ilustração da ação hormonal sob efeitos de protocolos de superovulação em bovinos fêmeas.



Fonte: Penitente Filho, 2011.

A manipulação da onda folicular para superovulação é baseada tradicionalmente no uso de dispositivos de progestágeno, estradiol, gonadotrofinas (FSH e LH), prostaglandina ($\text{PGF}_{2\alpha}$) e um indutor de ovulação (E2, GnRH, LH ou hCG). A superovulação bovina atualmente vem sendo amplamente pesquisada na tentativa de elevar os índices de produção embrionária. A manipulação da onda folicular com o uso de dispositivos intravaginais de progesterona em associação a aplicação intramuscular de estrógeno leva a uma atresia folicular e conseqüentemente desencadeia o desenvolvimento de uma nova onda folicular. Buscando evitar a dominância de um único folículo o tratamento associa, além do estrógeno e progesterona, concentrações decrescentes de FSH, levando então a um crescimento de diversos folículos simultaneamente na mesma onda. Após o protocolo de superovulação as doadoras devem ser inseminadas tendo um tempo previamente estipulado (BÓ et al., 2010).

Tendo um cio natural como base, existe a possibilidade de realizar um protocolo com a administração de oito aplicações de FSH exógeno por via intramuscular (IM) com intervalo entre as aplicações de 12 horas. No terceiro dia de tratamento com FSH aplica-se $\text{PGF}_{2\alpha}$ para luteólise, ocorrendo uma redução de progesterona e desencadeando em um pico de LH para uma posterior ovulação (Figura 6) (PENITENTE FILHO, 2011).

Tabela 3 - Protocolo hormonal de superovulação tendo base cio natural.

Manhã	Cio	FSH	FSH	FSH PGF2 α	FSH	Cio	IA
Tarde		FSH	FSH	FSH PGF2 α	FSH	IA	

Fonte: Adaptado de Rasi (2005).

Protocolos de superovulação tendo como base o cio natural, para aproveitamento da emergência de uma nova onda folicular, acabam nem sempre promovendo uma boa sincronia entre o momento da ovulação e a inseminação, levando ao aparecimento de um maior número de estruturas não fecundadas no lavado uterino. O uso do GnRH neste protocolo (Figura 7) é utilizado para se ter um maior controle do momento da ovulação (PENITENTE FILHO, 2011).

Tabela 4 - Protocolo hormonal de superovulação tendo base cio natural associado com GnRH/LH para Inseminação Artificial em tempo fixo.

Dia	0	10	11	12	13	14	17
Manhã	Cio	FSH	FSH	FSH PGF2 α	FSH	GnRH / LH	IA
Tarde		FSH	FSH	FSH PGF2 α	FSH	IA	

Fonte: Adaptado de Rasi (2005).

O protocolo para doadoras taurinas segundo o manual da Tecnopec (2008) é baseado na aplicação no dia do início do protocolo (D0) de 3 mg de benzoato de estradiol associado com dispositivo de liberação de P4 intravaginal. No D4 as aplicações de FSH iniciam, em 8 doses com intervalo de 12 horas entre as aplicações que devem ser feitas por via intramuscular. No D6 aplica-se PGF2 α , no D7 no mesmo horário em que se aplicou da PGF2 α no D6 retira-se o dispositivo intravaginal de progesterona. No D8 no mesmo horário dos manejos anteriores aplica-se, pela via intramuscular, indutores de ovulação (LH, GnRH e seus análogos ou hCG) desencadeando uma ovulação para que no D9 sejam feitas 2 inseminações artificiais com intervalo de 12 h. No D15 deve ser feita a coleta dos embriões por meio da lavagem uterina (Figura 8) (PENITENTE FILHO, 2011).

Tabela 5 - Protocolo de superovulação e inseminação em tempo fixo para doadoras taurinas.

Dia	0	4	5	6	7	8	9	17
Manhã	Inserir P4 + BE	FSH	FSH	FSH	FSH		IA	Coleta de embriões
Tarde		FSH	FSH	FSH + PGF α	FSH Retirada P4	LH	IA	

Fonte: Adaptado de Rasi (2005).

O protocolo de superovulação de doadoras zebuínas possui alteração no momento de aplicação do indutor de ovulação, sendo aplicado 12 horas antes do que o recomendado para taurinas. Isso se deve pelo fato de as doadoras zebuínas atingirem a capacidade ovulatória antes das vacas taurinas, levando em consideração o diâmetro folicular pré-ovulatório das doadoras zebuínas ser menor. A aplicação mais cedo do indutor de ovulação faz com que as inseminações também devam ser adiantadas em 12 horas (Figura 9) (PENITENTE FILHO, 2011).

Tabela 6 - Protocolo de superovulação e inseminação em tempo fixo para doadoras zebuínas.

Dia	0	4	5	6	7	8	9	17
Manhã	P4 + BE	FSH	FSH	FSH	FSH	LH	IA	Coleta de embriões
Tarde		FSH	FSH	FSH + PGF2 α	FSH Retirada de P4	IA		

Fonte: Adaptado de Rasi (2005).

3.1.2.1 FSH Exógeno

O número de embriões decorrentes de protocolos de superovulação em bovinos é extremamente variável (Tabela 3), sendo esta variação atribuída a fatores individuais de cada animal. Mesmo ao utilizar tratamentos idênticos podemos ter respostas altamente variáveis. A aplicação de FSH deve ser realizada por um período de 4 a 5 dias tendo intervalos entre as aplicações de cerca de 12 horas. Este intervalo entre as aplicações é estabelecido devido ao tempo de meia vida muito curta do FSH, cerca de 110 minutos. A concentração plasmática de

FSH possui aumento imediato e chegando a um pico em 3 horas após a aplicação (via intramuscular), e após o pico inicia um declínio gradual até não ser mais detectada com 12 horas após a aplicação (VISINTIN et al., 1999).

A forma de purificação do FSH utilizado para superovulação pode ser um ponto de influência direta nas respostas dos protocolos de superovulação, devido a presença de concentrações mais elevadas de LH, de acordo com o método de purificação utilizado, causando assim ovulações prematuras. O estado ovariano no início do protocolo é citado como outro fator determinante pois, algumas características ovarianas como a questão de dominância folicular, tamanho folicular e as condições dos folículos antrais podem afetar a resposta ovulatória frente ao tratamento hormonal (VISINTIN et al., 1999).

As raças zebuínas são consideradas com maior sensibilidade aos tratamentos hormonais de superovulação quando comparados a raças europeias. Os animais da raça Nelore possuem seus ovários, folículos, corpos lúteos menores que os animais taurinos, sendo um fator que pode estar diretamente relacionado a uma exigência de concentrações de FSH menores para uma resposta superovulatória (PRADO; TONIOLLO; OLIVEIRA, 2007)

Tendo conhecimento sobre a variação de resposta individual de superovulação, em animais taurinos para que se obtenha uma resposta frente a superovulação deve-se estabelecer doses totais entre 180 e 400 mg de FSH. No entanto para animais zebuínos as doses devem ser de 200 mg, ou seja, mais baixas do que as doses de animais taurinos (SANTOS, 2012).

Tabela 7 - Resultados encontrados após a colheita de embriões nas doadoras bovinas sob diferentes dosagens de tratamentos com suplementação exógena de FSH.

Tratamento (UI)	ED	OV	EV	Total
500	5	18	33	56
400	21	20	65	106
300	13	49	33	95
Total	39	87	131	257

Legenda: ED: Embriões degenerados; OV: Ovócitos; EV: Embriões Viáveis.

Fonte: Adaptado de Prado et al., 2007.

O tratamento de FSH deve ser aplicado em doses decrescentes nos animais a serem submetidos a protocolos de superovulação, visto que este manejo tem como objetivo camuflar

a queda fisiológica de FSH durante a fase folicular e visando uma resposta a melhor a superovulação (Tabela 4) (PENITENTE FILHO, 2011).

Tabela 8 – Protocolo para superovulação de fêmeas bovinas utilizando doses decrescente de FSH exógena.

Doadoras		
Dia	Manhã (07:00h)	Tarde (19:00h)
D1	Colocar implante P4. Aplicar 3 mg de Estrógeno.	-
D2	-	-
D3	-	-
D4	-	-
D5	FSH 4 ml – 80mg	FSH 4 ml – 80mg
D6	FSH 3 ml – 60mg	FSH 3 ml – 60mg
D7	FSH 2 ml – 40mg + PGF2- alfa	FSH 2 ml 40mg + PGF2- alfa
D8	FSH 1 ml – 20mg	FSH 1 ml – 20mg. Retirar implante.
D9	-	5 ml (0,2 mg) de indutor de ovulação (GnRH).
D10	1ª Inseminação	2ª Inseminação
D17	Coleta de Embriões	Coleta de Embriões

Fonte: Santos (2012).

3.2 Coleta dos embriões

Por cerca dos anos 1970 a maioria das coletas de embriões era feita de forma cirúrgica realizada com uma anestesia geral do animal. As coletas não cirúrgicas por meio de uma transposição cervical com sonda resultaram em uma técnica muito mais simples e segura por evitar os riscos de um processo anestésico geral. Levando estes pontos em consideração a maioria das recuperações embrionárias comerciais passaram a ser por meio de coleta não cirúrgica, a coleta via cérvix se torna possível com o uso de uma sonda de Foley (Figura 6) após mínimo de 6 dias e máximo de 8 dias a partir do momento esperado da ovulação sendo este o período necessário esperado para a migração dos embriões até o útero (BALL; PETERS, 2006).

Figura 06 – Sonda de Foley.



Fonte: Pravet, 2019.

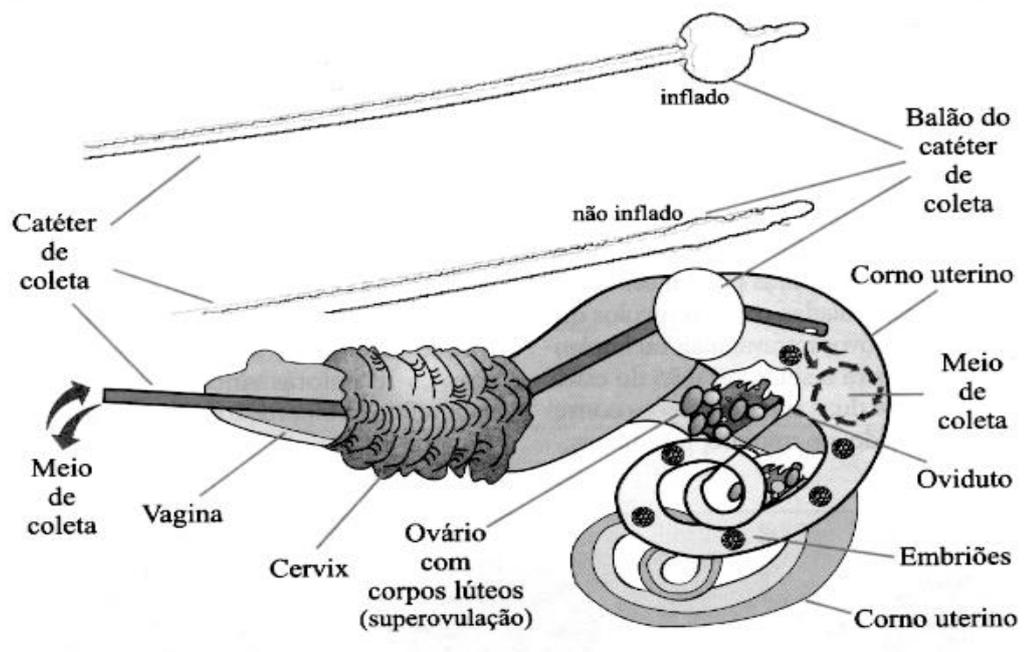
A coleta dos embriões necessita de alguns materiais para que o trabalho ocorra de forma correta, sendo eles: seringas e agulhas para aplicação dos fármacos e anestésicos, luvas de procedimento e palpação retal de bovinos, aplicadores de sêmen para a inseminação das doadoras, sêmen de boa qualidade, anestésicos para realização do bloqueio epidural, sonda de Foley de diversos calibres que devem ser ajustados de acordo com o cervix de cada animal, sendo as mais utilizadas as de calibre 18, 20 e 22, equipo de sistema fechado, meio DPBS para lavagem uterina, filtro coletor de embriões, placas de Petri, mesa aquecedora, lupa com aumento de 90x, pipetas e ponteiros, meio Holding, soro fetal bovino para a lavagem dos embriões, crioprotetor (etilenoglicol) caso os embriões sejam congelados, palhetas e lacres para envase dos embriões, inovuladores de embriões, bainha e camisinha sanitária, máquina de congelamento de embriões (PEREIRA, 2012).

A coleta é feita através de uma série de etapas, dentre elas:

1. Contenção da doadora no tronco de contenção;
2. Higienização do períneo da doadora, seguida de anestesia epidural;
3. Transposição cervical com mandril (Figura 7 e 8) e sonda de Foley;
4. Ancoragem da sonda inflando o balonete em um dos cornos uterinos;
5. Perfusão uterina com Meio Dulbecco's Modificado (DPBS) aquecido;
6. Conexão de equipo, sonda e filtro coletor (Figura 9);

7. Infusão, massagem e retirada do líquido passando pelo filtro coletor; (SANTOS, 2012).

Figura 7 – Ilustração de transposição cervical de sonda Foley para lavado uterino e coleta de embriões.



Fonte: Pereira, 2012.

Figura 8 – Mandril.



Fonte: Biodux, 2019.

Figura 9 – Filtro coletor de embriões.



Fonte: WTA, 2019.

3.2.1 Busca, avaliação e classificação dos embriões

Ao se findar a lavagem uterina, as estruturas embrionárias devem estar localizadas no filtro coletor. Para iniciar o processo de busca dos embriões, todo o líquido do filtro deve ser depositado em uma placa de Petri de 12 cm. O filtro deve ser lavado com auxílio de seringa e agulha sem pressão excessiva do êmbolo contendo DPBS seguidas vezes para minimizar o risco de algum embrião ficar aderido à parede ou ao filtro coletor. Lavando o filtro inicia-se a busca na placa com a utilização da lupa e com auxílio de micropipeta e ponteira. Ao lado, uma placa de petri de 3,5 cm contendo DPBS acrescido de soro fetal bovino se faz necessária para que os embriões coletados na placa de busca sejam alojados momentaneamente. Segundo Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (“International Embryo Transfer Society”- IETS) após a busca é feita a classificação e lavagem das estruturas viáveis a serem transferidas. A lavagem é realizada através da passagem dos embriões por 10 gotas de DPBS em placa de Petri de 12 cm visando reduzir possíveis contaminações. Durante este processo de busca e avaliação as estruturas que não são compatíveis com qualidade necessária para serem transferidas devem ser descartadas (BALL; PETERS, 2006).

A classificação embrionária é realizada através da evolução morfológica e qualidade. Existem estágios de desenvolvimento embrionário:

- Mórula: aglomerado celular cuja superfície possui blastômeros individuais que podem ser distinguidos.

- Mórula compacta: blastômeros individuais que não podem ser distinguidos na superfície do embrião.
- Blastocisto inicial: possui pequena cavidade, blastocele visível e início de desenvolvimento de massa celular interna.
- Blastocisto: embrião ocupando maior parte dentro da zona pelúcida.
- Blastocisto expandido: diâmetro embrionário aumentado, espessamento da zona pelúcida reduzido cerca de 1/3 do original.
- Blastocisto em eclosão: embrião iniciando processo de saída da zona pelúcida.
- Blastocisto eclodido: embrião desprovido de zona pelúcida, nítida presença de blastocele (PASA, 2008).

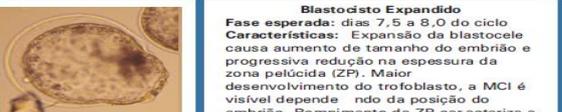
Para realizar uma avaliação morfológica são levados alguns pontos em consideração, sendo eles: forma esferoide, simetria dos blastômeros, aparência clara e nítida dos blastômeros, tonalidade uniforme, membrana celular uniforme; proporcionalidade entre embrião e espaço perivitelino, integridade da zona pelúcida, ausência de vacúolo e/ou fragmentos no embrião, ausência de fragmentos aderidos a zona pelúcida e compactação dos blastômeros (Figura 10) (PASA, 2008).

A classificação embrionária é feita de forma numérica de 1 a 4 e baseada na morfologia dos embriões. Sendo:

1. Excelente ou bom: o embrião possui simetria esférica, blastômeros uniformes, coloração homogênea. 85% do material celular deve estar intacto, zona pelúcida não deve apresentar concavidades. Os embriões de grau 1 podem ser congelados e podem ser comercializados.
2. Regular: embriões com irregularidades moderadas de massa, tamanho, cor e densidade. 50% da massa do embrião deve estar intacta. São embriões que podem ser transferidos, mas não devem ser congelados, com ressalvas de que a possibilidade de gerar uma gestação será reduzida quando comparada a embriões de grau 1.
3. Pobre: embriões que possuem maiores irregularidades na sua estrutura, tamanho, densidade e cor. 25% do embrião deve estar intacto. Estes embriões não resistem ao processo de congelamento e as taxas de prenhez são ainda menores com esta qualidade mesmo que transferidos a fresco.

4. Morto ou degenerado: oócitos, não são viáveis e devem ser descartados (BÓ; MAPLETOFT, 2013).

Figura 10 – Ilustração de embriões bovinos produzidos in vivo de acordo com o estágio de desenvolvimento.

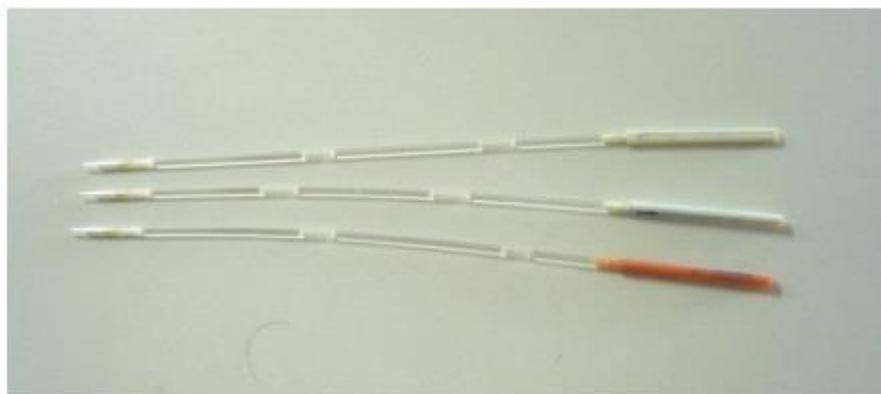
 <p>8 – 12 Células Código IETS: 2</p>	 <p>Mórula Código IETS: 3</p>	<p>Mórula Fase esperada: dias 5,5-6,0 do ciclo Características: Blastômeros ainda evidentes, porém não é mais possível determinar número exato. Massa de células ocupa maior parte do espaço dentro da zona pelúcida. Período caracterizado pelo fim da fase de celularização e da transição materno zigótica e início do processo de compactação.</p>
 <p>Mórula Compacta Código IETS: 4</p>		<p>Mórula Compacta Fase esperada: dias 6,0 a 6,5 do ciclo Características: Compactação torna a massa de células coesa, dificultando individualização dos blastômeros, e causa retração do embrião em relação à zona pelúcida, com aumento do espaço perivitelínico. Formação de junções de adesão e de oclusão entre as células, preparando o embrião para a formação da blastocela.</p>
 <p>Blastocisto Inicial Código IETS: 5</p>		<p>Blastocisto Inicial Fase esperada: dias 6,5 a 7,0 do ciclo Características: Blastômeros criam gradiente osmótico que atrai água para o espaço intercelular, iniciando a formação de uma cavidade denominada blastocela. Perda da totipotência, com a formação de duas populações celulares distintas: o trofoblasto, que se veste à blastocela, e a massa celular interna (MCI), lateral à blastocela.</p>
 <p>Blastocisto Código IETS: 6</p>		<p>Blastocisto Fase esperada: dias 7,0 a 7,5 do ciclo Características: Blastocela aumenta de tamanho, tornando-se proporcionalmente maior que a massa celular interna e ocupando gradualmente todo o espaço perivitelínico. Trofoblasto sofre diferenciações morfológicas e funcionais associadas à captação de nutrientes, enquanto as células da MCI mantêm potencialidade.</p>
 <p>Blastocisto Expandido Código IETS:</p>	 <p>Blastocisto Eclodido Código IETS: 8</p>	<p>Blastocisto Expandido Fase esperada: dias 7,5 a 8,0 do ciclo Características: Expansão da blastocela causa aumento de tamanho do embrião e progressiva redução na espessura da zona pelúcida (ZP). Maior desenvolvimento do trofoblasto, a MCI é visível dependendo da posição do embrião. Rompimento da ZP caracteriza a eclosão, com o embrião entrando em contato direto com os tecidos maternos.</p>

Fonte: Viana, 2013.

4 Envase

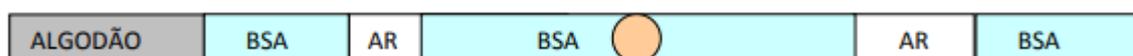
Para realizar a transferência dos embriões para as receptoras é necessário a realização do envase. Caso os embriões sejam transferidos no mesmo dia eles podem ser estocados por algumas horas sendo a temperatura controlada e próxima da temperatura corporal dos bovinos. É possível realizar o congelamento destes embriões por longos períodos de estocagem criopreservados a temperatura de -196°C e posteriormente descongelados. Os embriões são estocados individualmente em palhetas semelhantes às de inseminação artificial (Figura 11). O envase da palheta deve seguir um posicionamento adequado para que o embrião fique centralizado na palheta separadas por duas colunas de ar, isolando as extremidades do laque e êmbolo (Figura 12) (BALL; PETERS, 2006).

Figura 61 – Palhetas com embrião.



Fonte: Pereira, 2012.

Figura 12 – Esquema ilustrativo de envase de palheta com embrião.



Fonte: PENITENTE FILHO, 2011.

5 Estocagem dos embriões

Quando os embriões não são transferidos diretamente para as receptoras no mesmo dia, existe a possibilidade de realizar a criopreservação em botijões de nitrogênio líquido. Esta prática atualmente se tornou essencial nos sistemas de criação bovina pois possibilita a manutenção por longos períodos em estocagem adequada. Para desfrutar desta técnica são adicionados crioprotetores nas palhetas visando aumentar a viscosidade da solução e manter um equilíbrio osmótico entre a solução e o embrião. Estas substâncias possuem baixo peso molecular e são usadas com o objetivo de impedir alguns efeitos indesejáveis como a formação de cristais de gelo. Como exemplo de crioprotetores temos o etilenoglicol e glicerol (DALCIN; LUCCI, 2010).

6 Receptoras de embrião

Para que se tenha sucesso em todo o protocolo, o animal receptor deve estar em sincronia de ciclo estral com as doadoras, ou seja, as potenciais receptoras de embrião devem ter apresentado sinais de estro no mesmo dia que as doadoras ou com no máximo intervalo de

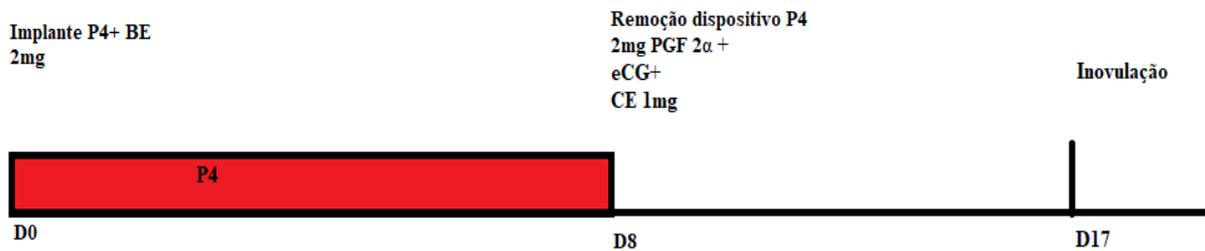
um dia antes ou depois, não devendo passar deste intervalo. Para que isso se torne possível deve-se utilizar de um protocolo de sincronização. Porém, caso tenham sido observados animais em cio natural que estejam em sincronia com as doadoras também podem ser utilizados como potenciais receptoras (BALL; PETERS, 2006).

As receptoras devem passar por um processo de seleção, onde alguns pontos são considerados muito importantes como: avaliação de escore corporal sem excessos e descartando extremos, infestação de endo/ectoparasitas controlada e exame clínico. Ao verificar estes parâmetros os animais considerados adequados passam por exames de palpação retal com auxílio de ultrassonografia para que sejam efetivadas como potenciais receptoras e sigam com um futuro protocolo hormonal de sincronização (DANTAS; NUNES; DANTAS, 2018).

Geralmente são utilizadas como receptoras animais cruzados, jovens, com boa capacidade de conversão alimentar, alta fertilidade e boa habilidade materna para animais que já tenham histórico de gestações anteriores. As receptoras não necessitam ficar restritas a um único uso e o reaproveitamento destes animais, favorece o produtor por não necessitar fazer a compra de novas receptoras. Porém, a cada novo protocolo deve-se reavaliar os animais de forma individual (PENITENTE FILHO, 2011).

Um exemplo de protocolo hormonal aplicado as receptoras (Figura 13) seria a introdução de dispositivo intravaginal de progesterona mais aplicação intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) no dia 0 do protocolo. No dia 8 remoção do dispositivo intravaginal, aplicação intramuscular de 2 mg de prostaglandina ($PGF_{2\alpha}$), gonadotrofina coriônica equina (eCG) e 1 mg de cipionato de estradiol (CE). Ao chegar no momento da inovulação dos embriões as receptoras devem passar por uma nova avaliação por meio de palpação retal para análise de resposta ao tratamento hormonal, nesta avaliação a resposta é avaliada por meio da presença de corpo lúteo no ovário da receptora. Sendo que os animais que não possuem estes requisitos não devem ser classificados como potenciais receptoras de embrião (DANTAS; NUNES; DANTAS, 2018).

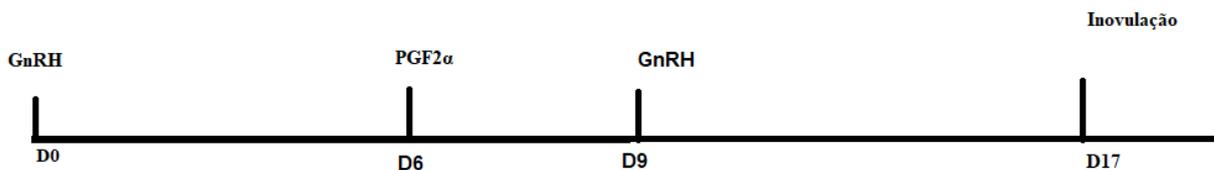
Figura 13 – Protocolo com uso de progesterona, benzoato de estradiol e gonadotrofina coriônica equina.



Fonte: Adaptado de Furtado et al., 2011.

Outra alternativa para sincronização de receptoras são os protocolos com administração de GnRH, os quais induzem uma liberação de LH. O aumento de LH induzirá a ovulação do folículo dominante da onda folicular ou luteinização dos folículos grandes presentes na onda. A ovulação do folículo dominante inicia a liberação de FSH, permitindo o recrutamento de uma nova onda folicular. A primeira aplicação de GnRH do protocolo consiste em liberar LH para que ocorra uma ovulação ou luteinização do folículo dominante, que conseqüentemente faz com que ocorra nova onda folicular dentro de um período esperado de 2 dias. No dia 7 do protocolo a aplicação intramuscular de $PGF2\alpha$ tem como função a luteólise. No dia 9 do protocolo mais uma dose de GnRH é feita para que ocorra uma nova liberação de LH e assim sincronizando a ovulação do folículo dominante (Figura 14) (PENITENTE FILHO, 2011).

Figura 14 – Protocolo OVYSYNCH de sincronização da ovulação de receptoras.



Fonte: Adaptado Penitente Filho, 2011.

7 Custos

Mesmo a transferência de embriões muito difundida no cenário mundial, existe uma variabilidade de resposta ao tratamento de superovulação muito grande, sendo este um fator muito importante para realizar previsões de custos e orçamentos. A TE como um todo engloba um conjunto de atividades necessárias para que um embrião seja coletado de uma doadora e

que uma receptora mantenha a gestação e consiga parir até que ocorra o desmame do produto. Mesmo com a evolução de novas descobertas de manipulação fisiológica, ainda permanece uma dependência da variabilidade de resposta individual frente aos protocolos hormonais. Usualmente o número de receptoras a serem protocoladas para um programa de TE é calculado com base no número médio de embriões coletados por doadora, mas alguns trabalhos descrevem que a escolha do número de receptoras pode ser sugerida de forma aleatória (BARIONI; QUIRINO; FERNANDES, 2007).

A necessidade de compra e de manutenção de receptoras representam um elevado custo dentro do processo de TE (Tabelas 5, 6, 7 e 8), a necessidade de adquirir e sincronizar receptoras mesmo antes de ter conhecimento do número de embriões por coleta desencadeiam em dificuldades de identificação de um número padrão ideal de receptoras (BELTRAME et al., 2007).

Tabela 9 – Valores considerados no cenário-base em uma fazenda.

Item	Base (R\$)
Custo de aquisição da doadora	15.000,00
Custo de manutenção da receptora	26,33
Custo de sincronização da receptora	12,00
Custo de manutenção da doadora	82,66
Custo de protocolo de superovulação	770,00
Honorários veterinários por doadora em coleta	500,00
Valor de venda da prenhez	1.500,00

Fonte: Beltrame et al., 2010.

Tabela 10 – Custo de manutenção médio/mês/animal.

Variável (animal/mês)	Valor (R\$)
Mineralização	1,43
Antiparasitários	1,28
Vacinações	1,54
Outros (medicamentos, exames, etc)	0,87
Total	5,12

Fonte: Adaptado de Beefpoint, 2004.

Tabela 11– Valores referentes ao material de consumo.

Variável	Valor (R\$)
Hormônios (Superovulação e sincronização)	770,00
Descartáveis (Placas, filtros, cateteres, etc)	184,00
Meios (de colheita e manipulação)	32,00
Total	986,00

Fonte: Adaptado de Beefpoint, 2004.

Tabela 12 – Valores médios referentes aos custos de produção de embriões.

Variável	Valor (R\$)
Custo médio do material de consumo/colheita	514,00
Custo da mão-de-obra/colheita	350,00
Gastos com sêmen/colheita	100,00
Custo total médio/colheita	964,00
Média de embriões viáveis/colheita	5,58 +/- 4,24
Valor médio de cada embrião viável	172,76

Fonte: Adaptado de Beefpoint, 2004.

8 Resultados esperados para TE

A TE é uma técnica de melhoramento genético de fundamental importância, pois proporciona a disseminação de animais superiores em um espaço de tempo reduzido, entretanto existem fatores que tornam inconvenientes para a técnica como exemplo a variação individual a respostas de superovulação e conseqüentemente variando a quantidade de embriões viáveis. Atualmente no âmbito mundial temos uma média de 6 embriões viáveis produzidos por coleta. Em termos de resultados de prenhez a TE varia entre 35% a 60%, sendo que as taxas mais elevadas geralmente são para embriões transferidos a fresco. Embriões congelados possuem taxa de prenhez um pouco reduzida quando comparados aos transferidos a fresco. Para embriões de raças zebuínas congelados espera-se cerca de 20% a menos de probabilidade de gestação do que embriões de taurinos. Uma coleta de 6 embriões viáveis gera em torno de 3 prenhezes em média. O procedimento de coleta e transferência de embrião pode ser feito em até 6 x ao ano, correspondendo a aproximadamente 36 embriões por ano/doadora (SANTOS, 2012).

9 Fatores que podem interferir negativamente na TE

Diversos fatores podem afetar negativamente nos resultados da TE, tais como: resposta da doadora ao protocolo hormonal estabelecido (tendo uma variação muito grande individualmente), erros humanos na aplicação do protocolo de superovulação, compreensão dos funcionários da necessidade da rotina de aplicação hormonal diária, armazenamento adequado dos hormônios, estado nutricional dos animais (tanto receptoras quanto doadoras) e a presença de touros próximos aos animais que estão tendo o ciclo estral manipulado (SANTOS; 2012).

10 Considerações finais

O uso de biotecnologias aplicadas a reprodução agrega aos criatórios grandes evoluções dos animais, sendo que ao desfrutar de técnicas como a TE podemos ter uma multiplicação de progênie destes animais superiores em um menor espaço de tempo, além da possibilidade de comercialização de embriões, podendo então implantar em diversos planteis animais geneticamente superiores sem que o proprietário necessite adquirir doadoras de embrião. A TE permite que diversas raças sejam implantadas em locais que não se tenha exemplares da raça através da inovulação de embriões oriundos de outras regiões sem que haja um período de adaptação do animal, o que ocorreria se o animal fosse introduzido quando já vivo. Entretanto para que a execução tenha resultados positivos, diversos fatores podem influenciar, como a capacidade de execução dos envolvidos, tanto o veterinário responsável quanto a equipe de funcionários que tem contato direto com os animais. Isto torna de suma importância a capacitação técnica de todos os profissionais envolvidos e sua constante atualização.

REFERÊNCIAS

- BALL, P J H; PETERS, A R. **Reprodução em Bovinos**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2006. 232 p.
- BARIONI, L.g.; QUIRINO, R. Travassos Beltrame; C.r.; FERNANDES, D. Rankel. Modelos determinista e estocástico em programas de transferência de embriões em bovinos. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Planaltina, v. 15, n. 3, p.111-117, 2007.
- BARROS, Ciro Moraes; NOGUEIRA, Marcelo F Gouvea. Superovulation in zebu cattle protocol p-36. **Researchgate**, São Paulo, v. 2, n. 23, p.1-22, jun. 2005.
- BARUSELLI, Pietro S. et al. Superovulation and embryo transfer in Bos indicus cattle. **Theriogenology**. São Paulo, p. 77-88. out. 2006.
- BELTRAME, Renato Travassos et al. Economic optimization of the number of recipients in bovine embryo transfer programs. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 3, n. 64, p.2-2, jun. 2007
- BEEFPOINT. **Custos relacionados à transferência de embriões em bovinos**. 2004. Disponível em: <<https://www.beefpoint.com.br/custos-relacionados-a-transferencia-de-embrioes-em-bovinos-21996/>>. Acesso em: 10 jun. 2019
- BELTRAME, Renato Travassos et al. Modelagem bioeconômica da transferência de embriões em bovinos. **Ci. Anim. Bras**, Goiania, v. 11, n. 1, p.32-41, 2010.
- BINELLI, Mario; TRENTINARO, Bruna; BISINOTTO, Rafael. Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. **Acta Scientiae Veterinariae**, São Paulo, p.1-7, 2006.
- BIODUX. **Mandril Ajustável**. Disponível em: <<http://biodux.com.br/site/index.php/mandril-ajustavel-p-sonda-te-bov.html>>. Acesso em: 06 jun. 2019
- BIOTECNICAS DA REPRODUÇÃO EM BOVINOS**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, out. 2014.

BÓ, Gabriel A.; MAPLETOFT, R.j. Evaluation and classification of bovine embryos. **Animal Reproduction**, Córdoba, v. 3, n. 10, p.344-348, set. 2013.

BÓ, Gabriel A. et al. New approaches to superovulation in the cow. **Reproduction: Fertility and Development**, Córdoba, n. 22, p.106-1112, out. 2010.

CUNNINGHAM, James G. Controle do Desenvolvimento das Gônadas e dos Gametas. In: CUNNINGHAM, James G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2. ed. East Lansing: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 34. p. 353-398.

DALCIN, L.; LUCCI, C.m. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual: Cryopreservation of livestock embryos: cryobiological principles and current status. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 3, p.149-159, set. 2010.

DANTAS, Kolowyskys Silva de Alencar; NUNES, Claudio Cabral Campello; José Ferreira; DANTAS, Raul Andrei de Assis. SELEÇÃO DE RECEPTORAS EM UM PROGRAMA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (PIVE) EM BOVINOS NO NORDESTE DO BRASI. **Ciência Animal**, Fortaleza, n. 28, p.1-14, 2018.

FERRAZ, Henrique Trevizoli et al. Sincronização da ovulação para realização da inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. **Pubvet**, Goiania, p.12-12, mar. 2008. Disponível em: <file:///D:/TCC%20Gustavo/ARTIGOS/sincronizacao%20de%20onda%20folicular.pdf>. Acesso em: 12 maio 2019.

FURTADO, Diego Augusto et al. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BOVINOS DE CORTE. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Graça, v. 9, n. 16, p.01-25, jan. 2011.

GUIDO, M.C. Transferência de embriões, São Paulo 2005. Disponível em: <http://eagaspar.com.br/mcguido/transf__embriao.htm>. Acesso em 15 maio. 2019.

MAGALHÃES, D M et al. Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I): importantes reguladores das foliculogêneses in vivo e in vitro. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 36, n. 1, p.32-38, mar. 2012.

MARTINEZ, Igor Nascimento; SOUZA, Leandro Cesar de. **Transferência de embrião e fertilização invitro em bovinos.**2007. 88 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2007.

MELLO, Raquel R C et al. Aspectos da dinâmica folicular de bovinos. **Acsa**, Patos, v. 10, n. 4, p.01-06, dez. 2014.

OEMBRIÃO: -. São Paulo, 1 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.sbte.org.br/jornal>>. Acesso em: 12 maio 2019

OLIVEIRA, M.e.f.; FERREIRA, R.m.; MINGOTI, G.z. Controle do crescimento e da seleção folicular por fatores locais e sistêmicos na espécie bovina: Local and systemic control of bovine follicular growth and selection. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 4, n. 35, p.418-432, dez. 2011.

PASA, Camila. **Transferência de embriões em bovinos.** 2008. 9 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, UFMT, Cuiabá, 2008.

PENITENTE FILHO, Jurandy Mauro. **PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS IN VIVO E IN VITRO.** 2011. 22 f. Monografia (Especialização) - Curso de Medicina Veterinária, UFV, Viçosa, 2011.

PEREIRA, Nathanael Pezarini. **Transferência de embriões em bovinos.** 2012. 86 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Tuiuti, Curitiba, 2012.

PRADO, F. R. A.; TONIOLLO, G. H.; OLIVEIRA, J. A. SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA EM VACAS DA RAÇA GIR LEITEIRO COM USO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FSH: OVARIAN SUPERSTIMULATION IN GIR LEITEIRO COWS WITH DIFFERENT CONCENTRATIONS OF FS. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 3, n. 23, p.172-177, 2007.

PRAVET. **SONDA FOLEY 2 VIAS COM BALÃO INFLÁVEL**. Disponível em: <<https://www.pravet.com.br/sonda-foley-2-vias-com-balao-inflavel-18>>. Acesso em: 06 jun. 2019.

+55

RASI, Fabrício Almeida Prado **Técnicas de superovulação, colheita e transferência de embriões em bovinos**. 2005. 27 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005

SANTOS, Giancarlo Magalhaes dos. **Transferência de embriões**. Viçosa: Cpt, 2012.

SANTOS, Priscila Helena dos. **Impactos da superestimulação ovariana sobre diferenciação das células da granulosa bovina**. 2017. 60 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017

SEIDEL JUNIOR, George E.; SEIDEL, Sarah Moore. **Training manual for embryo transfer in cattle**. Fort Collins: Fao Animal Production And Health Paper, 2005. 144 p.

TECNOPEC. **SUPEROVULAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM TEMPO FIXO**. 2010. Disponível em: <file:///C:/Users/Maria/Downloads/MANUAL_TECNICO_SUPEROVULACAO_E_TRANSFERE.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2019.

VALLE, Ezequiel Rodrigues do. **Ciclo estral de bovinos e métodos de controle**. Campo Grande: Embrapa, 1991. 33 p.

VIANA, Joao Henrique Moreira. **Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo**. 2013. Disponível em: <<https://pt.engormix.com/pecuaria-leite/artigos/classificacao-embrioes-bovinos-produzidos-t37792.htm>>. Acesso em: 30 maio 2019.

VISINTIN, José Antonio et al. Superovulação de novilhas da raça Nelore com diferentes doses de FSH/LH e congelamento de embriões pelo método one-step com etilenoglicol. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 36, n. 5, p.1-11, 1999.

WTA. **Filtro para TE**. Disponível em: <<https://www.wtavet.com.br/product-page/filtro-para-te-10043>>. Acesso em: 06 jun. 2019.