

# Trabalho Conclusão Curso

Fabio Junior Arruda de Lima

## TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM TEMPO FIXO EM BOVINOS: RELATO DE CASO

Curitibanos

2018



Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Rurais  
Curso de Medicina Veterinária

Fabio Junior Arruda de Lima

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM TEMPO FIXO EM BOVINOS:  
RELATO DE CASO

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Medicina Veterinária do Centro de Ciências Rurais, Campus Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Giuliano Moraes Figueiró

Curitibanos

2018

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

Lima, Fabio Junior Arruda  
Transferência de embriões em tempo fixo em bovinos:  
Relato de caso / Fabio Junior Arruda Lima ; orientador,  
Giuliano Moraes Figueiró, 2018.  
51 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus  
Curitibanos, Graduação em Medicina Veterinária,  
Curitibanos, 2018.

Inclui referências.

1. Medicina Veterinária. 2. Transferência de embriões  
em bovinos. 3. Superovulação. 4. Reprodução animal. I.  
Figueiró, Giuliano Moraes. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Graduação em Medicina Veterinária. III.  
Título.

Fabio Junior Arruda de Lima

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM TEMPO FIXO EM BOVINOS: RELATO  
DE CASO

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de  
“Médico veterinário” e aprovado em sua forma final.

Curitiba, 29 de junho de 2018

---

Prof. Alexandre, de Oliveira Tavela, Dr.  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

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

---

Prof. Marcos Henrique Barreta, Dr.  
Avaliador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Méd. Vet. Mailton Rafael Wolfart  
Avaliador  
Médico Veterinário Autônomo

Dedico este trabalho à minha esposa Simara Ap<sup>a</sup> Ribeiro,  
meus amigos e com muito carinho aos meus pais, pessoas  
humildes, mas que pela educação me fizeram o ser humano  
que sou.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus amigos de trabalho e colegas de graduação que sempre me ajudaram durante esta etapa para que eu conseguisse vencer mais este desafio.

Aos meus professores da UFSC e da UNIFACVEST por todo o conhecimento transmitido, em especial ao meu orientador Prof. Dr. Giuliano Moraes Figueiró, que me auxiliou durante essa etapa de conclusão e durante todo o período em que fui seu aluno; também ao prof. Dr. Alexandre de Oliveira Tavela que não mediu esforços desde que cheguei à universidade, vindo de outra instituição, conseguiu me organizar em uma turma para que concluísse a graduação no tempo adequado.

A administração da UFSC Câmpus Curitibanos, especialmente a minha chefia, Paulo Roberto Kammer, que sempre se mostrou flexível ajudando a elaborar a tabela do horário especial e respaldando minhas solicitações, entendendo sempre de forma humana a dificuldade de se estudar em universidade federal e trabalhar concomitantemente.

A minha esposa Simara, pelo total apoio e incentivo durante estes anos de muito estudo, trabalho e empenho; sempre esteve ao meu lado durante este período com palavras e ações motivadoras a medida que a insegurança frente aos desafios ia surgindo.

Aos Médicos Veterinários André e Mailton, com os quais tive a oportunidade de aprender muito durante o período de estágio obrigatório, agradeço pela humildade, paciência e pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

E especialmente a meus pais, Jovino e Analia, agricultores de pouca escolaridade, gente humilde, mas honesta como tantos outros brasileiros; que me acompanharam desde os primeiros passos, viram minha primeira aula de alfabetização lá numa Escolinha Isolada no interior de Paineel – SC e estiveram ao meu lado durante toda minha formação escolar. Queria dizer que as caminhadas de cerca de três quilômetros diários ao amanhecer com um lampião improvisado em meio aos invernos gelados da minha cidadezinha para que eu pudesse pegar o ônibus escolar não foram em vão. Pai e mãe obrigado!

A todos que de alguma maneira contribuíram para a minha formação e que são especiais em minha vida, o meu muito obrigado.

*“Acredite na força dos seus sonhos. Deus é justo e não colocaria em seu coração um desejo impossível de ser realizado. ”*  
*(Autor desconhecido)*

## **RESUMO**

Este trabalho tem por objetivo fazer uma breve revisão bibliográfica a respeito da fisiologia do ciclo estral dos bovinos e sobre a biotecnologia de transferência de embriões nessa espécie. Outro objetivo é relatar um protocolo de transferências de embriões realizadas na Fazenda Butiá Verde no município de Fraiburgo, estado de Santa Catarina durante o mês de fevereiro de 2018, detalhando a resposta à superovulação das doadoras e a taxa de prenhez das receptoras, materiais e instrumento utilizados. As coletas foram realizadas pelo método de lavagem uterina transcervical não cirúrgicas onde foram utilizadas três vacas doadoras da raça Charolês e dez vacas receptoras mestiças simental. Os resultados alcançados considerando os embriões transferidos foram satisfatórios, obtendo-se uma taxa de prenhez de 57,14%.

**Palavras-chave:** Transferência. Embriões. Superovulação.

## **ABSTRACT**

This work aims to make a brief bibliographical review on the physiology of the estrous cycle of cattle and on the biotechnology of embryo transfer in this species. Another objective is to report an embryo transfer protocol performed at Fazenda Butiá Verde in the municipality of Fraiburgo, state of Santa Catarina, during the month of February 2018, detailing the response to donor superovulation and the pregnancy rate of the recipients, materials and instrument used. The collections were performed by the non-surgical transcervical uterine lavage method, where three donor cows of the Charolais breed and ten crossbred recipients cows were used. The results obtained considering the embryos transferred were satisfactory, obtaining a pregnancy rate of 57.14%.

**Keywords:** 1. Transfer. Embryos. Superovulation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema das etapas principais da foliculogênese nos ruminantes .....	19
Figura 2 - Imagem esquemática das fases do ciclo estral em bovinos .....	22
Figura 3 - Doadoras de embriões da raça Charolês da Fazenda Butiá Verde. ....	27
Figura 4 - Lote de receptoras da Fazenda Butiá Verde .....	28
Figura 5 - Desenho esquemático da ação hormonal durante processo de superovulação em bovinos .....	30
Figura 6 - Desenho esquemático de lavagem uterina e colheita de embriões .....	32
Figura 7 - Estágios de desenvolvimento embrionário, considerando-se os estágios de desenvolvimento bem como os códigos recomendados pela IETS.....	34
Figura 8 - Doadora da Fazenda Butiá Verde momentos antes da colheita de embriões	36
Figura 9 - Materiais utilizados no procedimento TE de embriões na Fazenda Butiá Verde .....	40
Figura 10 - Sistema fechado de coleta de embriões .....	41
Figura 11 - Procedimento de lavagem uterina para coleta de embriões .....	42
Figura 12 - Conteúdo de lavagem uterina contendo embriões depositado em placa de Petri.....	43
Figura 13 - Classificação dos embriões com auxílio de estereomicroscópio .....	43
Figura 14 - Palheta contendo o embrião para ser inovulado e inovulador já montado revestido por camisa sanitária .....	44
Figura 15 - Embriões obtidos da doadora D1 durante a TE .....	45
Figura 16 - Embriões obtidos da doadora D2 durante a TE .....	46

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Classificação dos embriões segundo a qualidade .....	34
Tabela 2 - Protocolo hormonal de superovulação utilizado pelo médico veterinário Mailton Rafael Wolfart para vacas doadoras de embriões da Fazenda Butiá Verde .....	38
Tabela 3 - Tabela 3 – Protocolo de sincronização das receptoras implantado pelo médico veterinário Mailton Rafael Wolfart na Fazenda Butiá Verde .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE – Benzoato de Estradiol  
BSA – Albumina Sérica Bovina  
CE – Ciclo Estral  
CL – Corpo Lúteo  
DEP – Diferença Esperada na Progênie  
D1 – Doadora de embriões número um  
D2 – Doadora de embriões número dois  
D3 – Doadora de embriões número três  
Ecg – Gonodotrofina Coriônica Equina  
ECP – Cipionato de Estradiol  
E2 – Estradiol  
FD – Folículo Dominante  
FSH – Hormônio Folículo Estimulante  
GnRH – Hormônio Liberador de Gonodotrofinas  
Hmg – Gonodotrofina Menopáusica Humana  
IA – Inseminação Artificial  
IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo  
IETS – Sociedade Internacional de Transferência de Embriões  
LH – Hormônio Luteinizante  
PBS – Solução Salina Tamponada em Fosfato  
PGF<sub>2α</sub> – Prostaglandina  
PO – Puro por Origem  
P4 – Progesterona  
SC – Santa Catarina  
SFB – Soro Fetal Bovino  
SOV – Superovulação  
TE – Transferência de Embriões

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 OBJETIVOS .....	16
<b>1.1.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>16</b>
<b>2 FISIOLOGIA DA REPRODUÇÃO BOVINA</b> .....	<b>17</b>
2.1 FOLICULOGÊNESE .....	17
<b>2.2.1 Formação dos Folículos Primordiais</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2.2 Crescimento Folicular</b> .....	<b>18</b>
2.2 NEUROENDOCRINOLOGIA DA REPRODUÇÃO .....	19
<b>2.2.1 Principais Hormônios Envolvidos na Foliculogênese</b> .....	<b>20</b>
2.2.1.1 GnRH .....	20
2.2.1.2 Gonadotrofinas LH e FSH .....	20
2.2.1.3 Estradiol .....	20
2.2.1.4 Progesterona .....	21
2.2.1.5 Inibinas e Ativinas .....	21
2.3 CICLO ESTRAL DOS BOVINOS .....	22
<b>2.3.1 Estro</b> .....	<b>23</b>
<b>2.3.2 Metaestro</b> .....	<b>23</b>
<b>2.3.3 Diestro</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3.4 Proestro</b> .....	<b>24</b>
<b>3 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS</b> .....	<b>24</b>
3.1 PRINCÍPIOS DA SUPEROVULAÇÃO.....	25
3.2 CONTROLE SANITÁRIO .....	26
3.3 SELEÇÃO DAS DOADORAS .....	26
3.4 SELEÇÃO DAS RECEPTORAS .....	27
3.5 CONTROLE E SINCRONIZAÇÃO DO CICLO ESTRAL DAS DOADORAS E RECEPTORAS .....	29
<b>3.5.1 Sincronização das Doadoras</b> .....	<b>29</b>
<b>3.5.2 Sincronização das Receptoras</b> .....	<b>30</b>
3.6 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL DAS DOADORAS .....	31
3.7 COLHEITAS DE EMBRIÕES .....	31

3.8	BUSCA E CLASSIFICAÇÃO EMBRIONÁRIA.....	33
3.9	INOVULAÇÃO .....	35
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A técnica de transferência de embriões em bovinos (TE) está se difundido cada vez mais no sistema de produção bovina brasileiro, este método apesar de mais oneroso que outras biotécnicas reprodutivas com a inseminação artificial (IA) e inseminação artificial em tempo fixo (IATF), possui como diferencial o fator de possibilitar maior rapidez e eficiência, mesmo em pequenos rebanhos, possibilitando a uma fêmea produzir um número de descendentes muito superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva, aliado a isto proporciona a disseminação do material genético de animais zootecnicamente superiores.

O conhecimento avançado da anatomia e fisiologia reprodutiva da vaca é requisito essencial ao profissional que trabalha com esta biotecnologia, além disso, o médico veterinário deve ter conhecimento suficiente para escolher além das doadoras as melhores receptoras, pois apesar de serem consideradas animais de menor valor deverão apresentar características funcionais, sanitárias e de temperamento que possibilitem-nas desenvolver a sua habilidade materna.

O presente trabalho tem por objetivo contribuir para um melhor entendimento, aperfeiçoamento e ampliação da transferência de embrião em bovinos a partir de uma breve revisão bibliográfica acerca da fisiologia do ciclo estral das fêmeas desta espécie, e por último relatar e discutir um protocolo de transferência de embriões realizado na Fazenda Butiá Verde município de Fraiburgo - SC; detalhando a técnica, tratamento hormonal e equipamentos utilizados, bem como os resultados alcançados.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Relatar protocolo de transferência de embriões em bovinos realizado na Fazenda Butiá Verde em Fraiburgo – SC durante o mês de fevereiro do ano de 2018, destacando a taxa de produção de estruturas viáveis por doadoras, taxa de prenhez das receptoras, tendo como propósito fornecer informação para futuras coletas e consequente melhora dos índices reprodutivos da propriedade.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Revisar na literatura existente aspectos fisiológicos do ciclo estral das vacas.
- Explicar brevemente a função dos hormônios endógenos no processo de superovulação.
- Sintetizar a técnica e descrever os equipamentos utilizados na transferência de embriões.
- Identificar a resposta individual dos animais ao protocolo hormonal utilizado.
- Descrever a taxa de prenhez confirmadas dos embriões que foram inovulados nas receptoras.

## **2 FISILOGIA DA REPRODUÇÃO BOVINA**

As vacas assim como as demais fêmeas ruminantes domésticas são poliéstricas, anuais apresentando estros em intervalos mais ou menos regulares de 21 dias. Durante o ciclo estral ocorre uma cadeia de eventos que se repetem até o impedimento da luteólise pela gestação. Nas fêmeas ruminantes, o processo de foliculogênese (ativação, crescimento/maturação folicular) tem início com a formação dos folículos primordiais nas suas gônadas (GONÇALVES et al., 2008).

### **2.1 FOLICULOGÊNESE**

A foliculogênese pode também ser definida como um processo de desenvolvimento de um folículo primordial ativado até o tamanho de folículo pré-ovulatório, acompanhando o crescimento e a diferenciação do ovócito e da camada de células da granulosa que o circunda (ADAMS E JAISWAL, 2008). A foliculogênese ovariana é processo longo e contínuo, controlado pela interação de diversos fatores (WEBB et al., 2004 – 2008).

Em bovinos, a função ovariana é regulada pela interação entre os mecanismos feedback sistêmicos e locais envolvendo GnRH hipotalâmico e gonodotrofinas hipofisárias, além de esteroides e proteínas dos ovários. Segundo MCNATTY et al. (1999) e HANZEN et al. (2000), a foliculogênese apresenta três etapas: a multiplicação de folículos primordiais (fase fetal), o crescimento folicular (folículos primordiais gonodotrofinos independentes e dependentes) em estágios mais avançados e a maturação de folículo (FERREIRA, 2010).

#### **2.1.1 Formação dos folículos primordiais**

A formação das oogônias e dos folículos primordiais, bem como do início do crescimento destes ocorre na ausência de gonodotrofinas hipofisárias (RICHARDS, 2001). As células germinativas primordiais migram do epitélio do saco vitelino para a crista genital e localizam-se na gônada rudimentar ainda indiferenciada no início da vida fetal das fêmeas bovinas (entre o 1º e 2º mês), sendo denominadas oogônias (SMITZ e CORTVRINDT, 2002). Chegando as gônadas, as células germinativas continuam a se multiplicar por divisões mitóticas, alcançado o máximo estimado de 2,1 milhões e, quando termina esse processo, tem início a divisão meiótica, que é interrompida em fase de diplóteno da prófase I. Passam então a

ser denominados ovócitos, quando são circundadas por uma única e estreita camada de células pré-granulosas achatadas, formando os folículos primordiais (FORTUNE, 2003).

O contato das ovogônias com as células mesonéfricas é indispensável para transformar ovogônia em ovócito primário. Todos os ovócitos que não forem incorporados aos folículos primordiais degeneram. Assim, o ovário fetal possui vários milhões de folículos primordiais, a maioria dos quais degenera na vida pré ou pós fetal (FERREIRA, 2010).

Durante a vida reprodutiva, o crescimento não ocorre em mais de 1% do estoque folicular, o qual vai atresiar ou ovular, com os demais permanecendo estocados e sofrendo apoptose em processo contínuo e dinâmico, com sobrevivência de pequena proporção (FERREIRA, 2010).

### **2.1.2 Crescimento folicular**

O crescimento e a maturação folicular representam uma série de transformações subcelulares e moleculares, de forma sequencial, de vários componentes do folículo: o oócito e as células da granulosa e da teca. Tais transformações são controladas por fatores intraovarianos diversos, fatores intrafoliculares e sinais hormonais, que levam a secreção de andrógenos (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O crescimento folicular envolve a proliferação e diferenciação induzidas hormonalmente, tanto das células da teca como da granulosa. Tais processos levam a uma habilidade crescente dos folículos para produzirem estradiol e responderem a gonodrofinas. A produção de estradiol determina qual folículo obterá um número de receptores para LH necessário para a ovulação e luteinização. Distúrbio na habilidade das células da teca e da granulosa em responder aos sinais gonodróficos levam a cessação do crescimento e ao início da atresia do folículo (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

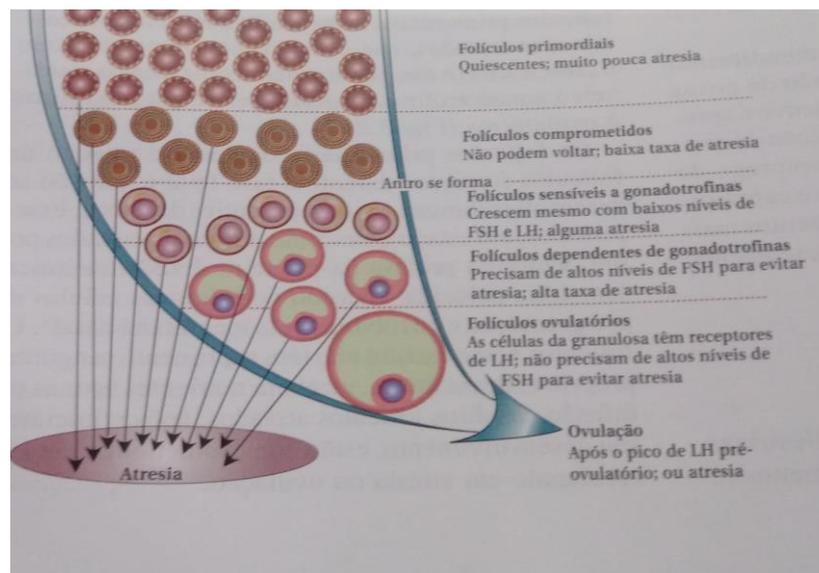
O estágio mais avançado do crescimento folicular está bem caracterizado pela presença de duas ou três ondas de crescimento folicular durante cada ciclo estral, as quais já são observadas antes mesmo da puberdade e durante os períodos de anestro (OLIVEIRA et al., 2011). Cada onda de crescimento folicular em bovinos é caracterizada pelo recrutamento de um grupo de folículos (emergência), os quais continuam a crescer até passarem pela seleção folicular (FERREIRA, 2010).

Na fase final de desenvolvimento folicular, após a divergência folicular, é observada a expressão de receptores de LH da camada de células da granulosa (GONÇALVES et al.,

2008). O folículo dominante secreta grande quantidade de estradiol e também é responsável pela secreção da inibina liberada na circulação que estimula a regressão dos demais folículos.

A ovulação do folículo dominante selecionado requer condições endócrinas favoráveis. Se a regressão luteal ocorre ainda durante a fase de crescimento do folículo dominante, a queda dos níveis de progesterona permite o aumento da frequência dos pulsos de LH, estimulado pelo aumento da produção de estradiol do folículo dominante. O aumento da pulsatilidade do LH culmina então no pico de LH necessário à ovulação e à maturação oocitária com retomada da meiose que havia sido interrompida no início do desenvolvimento folicular (FIGURA 1). Caso não ocorra luteólise enquanto o folículo dominante permanece viável, ele regride e deixa de inibir a secreção de FSH, possibilitando a emergência de uma nova onda folicular (BURATINI JUNIOR, 2006).

Figura 1 – Esquema das etapas principais da foliculogênese nos ruminantes.



Fonte: Gonçalves (2008).

## 2.2 NEUROENDOCRINOLOGIA DA REPRODUÇÃO

A reprodução em bovinos representa um mecanismo complexo regulado pelo eixo-hipotalâmico-hipofisário-gonadal, sendo influenciado por fatores nutricionais, sanitários, hereditários e de manejo. As funções orgânicas são reguladas pelo sistema nervoso e endócrino, existindo estreita ligação entre os mesmos, como se verifica na secreção dos hormônios reprodutivos da adenohipófise (FSH e LH), que ocorre em resposta atividade neurosecretora de hormônios ou fatores liberadores pelo hipotálamo (FERREIRA,2010)

Um hormônio é classicamente definido como uma substância química fisiológica, orgânica, sintetizada e secretada por uma glândula endócrina sem ducto e transportada via corrente circulatória. Os hormônios têm a ação básica de inibir, estimular ou regular a atividade funcional de seus órgãos ou tecidos-alvo. Entretanto, órgãos como o útero e o hipotálamo produzem hormônios que não se encaixam nessa definição clássica (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

## **2.2.1 Principais hormônios envolvidos na foliculogênese**

### **2.2.1.1 GnRH**

Hormônio liberador de gonadotrofinas é produzido no hipotálamo, sendo responsável pela secreção e liberação de FSH e LH na hipófise, este hormônio ocupa papel central na função reprodutiva de bovinos e, uma vez liberado chega a hipófise através de um sistema peculiar de vasos denominado “Sistema Porta-Hipotálamico-Hipofisário”, que tem como característica um primeiro plexo capilar localizado no hipotálamo entre a artéria hipofisária superior e os longos vasos portais (FERREIRA, 2010). Uma descarga de GnRH induz um pico de LH e pode induzir a ovulação.

### **2.2.1.2 Gonadotrofinas LH e FSH**

O FSH (hormônio folículo estimulante) secretado pela hipófise estimula o crescimento e a maturação do folículo dominante ou folículo De Graaf, por si só o FSH não causa secreção de estrógeno no ovário, ao contrário ele necessita da presença de LH para estimular a produção estrogênica (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O LH (hormônio luteinizante) é também produzido na hipófise e tem importante função no processo de conversão do colesterol em andrógenos. O pico pré-ovulatório do LH é responsável pela ruptura da parede do folículo dominante induzindo a ovulação e posteriormente luteinização para formação do CL (FERREIRA, 2010).

### **2.2.1.3 Estradiol**

O estradiol é o estrógeno primário, produzido pelas gônadas está sob controle endócrino da hipófise anterior, como os demais estrógenos é carregado na corrente circulatória

por meio de proteínas ligadoras. Segundo HAFEZ e HAFEZ o estrógeno tem uma gama de funções fisiológicas, sendo que algumas delas são:

- Atuação no SNC induzindo o comportamento de cio nas fêmeas.
- Atuação no útero aumentando tanto a amplitude quanto a frequência de contrações, potencializando os efeitos da ocitocina e da  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .
- Desenvolvimento físico das características sexuais secundárias femininas.
- Estimular o desenvolvimento dos ductos e desenvolver as glândulas mamárias.
- Exercer efeito de retroalimentação tanto negativos quanto positivos no controle de liberação tanto de LH quanto de FSH.

Em ruminantes, também possuem um efeito anabólico proteico, aumentando o ganho de peso e o crescimento (HAFES e HAFES, 2004).

#### 2.2.1.4 Progesterona

A progesterona é secretada pelas células luteínicas do corpo lúteo, pela placenta e pelas glândulas adrenais. Sua secreção é estimulada primariamente pela LH. Segundo Hafez e HAFEZ, 2004 a progesterona desempenha as seguintes funções:

- Prepara o endométrio para implantação e manutenção da prenhez, aumentando a atividade secretora das glândulas do endométrio e inibindo a motilidade do miométrio.
- Atua de forma sinérgica com o estrógeno na indução do comportamento de cio.
- Auxilia no desenvolvimento do tecido secretor, como os alvéolos das glândulas mamárias.
- Provoca a inibição do cio e do pico pré-ovulatório do LH quando em picos mais elevados.

#### 2.2.1.5 Inibinas e Ativinas

As inibinas são produzidas pelas células da granulosa nas fêmeas e não se tratam de esteroides, mas sim glicoproteínas. As inibinas desempenham um papel importante na

regulação hormonal da foliculogênese ovariana durante o ciclo estral; atuam como sinalizadores químicos para a hipófise sobre o número de folículo em crescimento no ovário. A inibina reduz a secreção de FSH até um certo nível, o que mantém o número de ovulações espécies-específicas sem interferir na liberação de LH. Em síntese, nos bovinos ela é responsável para que o folículo dominante termine seu processo de maturação e através da diminuição da liberação da FSH ocorra uma atresia dos demais folículos (FERREIRA, 2010).

As ativinas são secretadas nos ovários pelas células da granulosa, bem como na hipófise tem principalmente as funções de reduzir a atresia e aumentar o diâmetro folicular a partir do folículo primário, também possui ação sinérgica com FSH no estímulo da atividade aromatase para maior síntese de estradiol (FERREIRA, 2010).

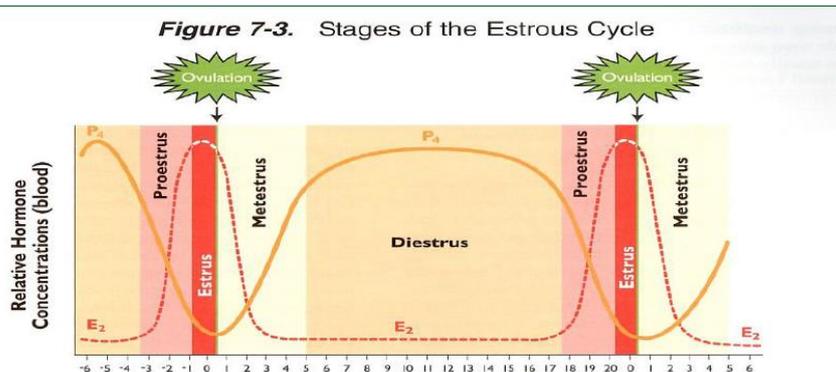
### 2.3 CICLO ESTRAL DOS BOVINOS

A vaca é considerada poliéstrica anual, apresentando CE durante o ano todo, é espécie mono-ovular, ou seja, apenas um ovócito atinge maturidade no final de CE. O CE pode ser dividido em duas fases distintas de acordo com a estrutura dominante presente no ovário durante cada fase do ciclo (SENGER, 2003).

Fase folicular que vai da regressão do CL à ovulação corresponde a 20 % da duração do CE. Durante esta fase, a estrutura primária do ovário é o folículo dominante (FD) que produz E2 e pequenos pulsos de GnRH (FERREIRA, 2010).

Fase luteal que vai da ovulação até a regressão do CL e corresponde a 80% de duração do CE. Durante esta fase a estrutura dominante é o CL, o hormônio reprodutivo predominante é a progesterona (P4). Durante este período, os pulsos de GnRH ocorrem a cada 4 -8 horas. O pico de LH na fase pré-ovulatória é no mínimo dez vezes maior do que no pulso tônico (SENGER, 2003)

Figura 2- Imagem esquemática das fases do ciclo estral em bovinos.



Fonte: Senger (2006)

De maneira mais detalhada, outros teóricos consideram que o ciclo estral pode ser dividido em quatro fases, sendo elas: estro, metaestro, diestro e proestro, como pode ser percebido na FIGURA 2

### **2.3.1 Estro**

O estro também popularmente conhecido como cio é considerado o dia 0 do CE, é a fase mais conhecida por ser conhecida pelos visíveis sintomas comportamentais de receptividade sexual (locomoção, expressão vocal, nervosismo, esforço para montar em outros animais, etc.). O estro é mais longo em raças europeias se comparado a raças zebuínas, ocorre nas horas com temperatura mais amenas do dia. No cio, os níveis circulantes de E2 são mais elevados no início e são responsáveis pelos sinais característicos como útero edemaciado, cérvix relaxada, vagina e vulva com sinais de hiperemia e edema, além do corrimento de muco. Durante o cio ocorre, um aumento da temperatura corporal de 0,5 a 0,8 C°, com diminuição durante a ovulação (FERREIRA, 2010).

Fisiologicamente o Folículo de Graaf secreta estrógenos, particularmente o 17 $\beta$ -estradiol. Os níveis crescentes de estradiol induzem o cio comportamental e, em combinação com o declínio nos níveis de P4, acionam o pico de LH, se um folículo estiver presente, o pico de LH provocará a ovulação em cerca de 24 horas (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

### **2.3.2 Metaestro**

Metaestro em bovinos é considerado o período que vai do final do cio até 5º dia do CE (BOWEN e BURGHARDT, 2000; SENGER, 2003). Fase em que o folículo maduro antral se rompe, eliminando seu conteúdo de líquido folicular na cavidade abdominal e liberando o ócito não fertilizado, ainda cercado pelas células dos cúmulos (BALL e PETERS, 2006). Pode ser considerada uma fase progesterônica, pois, seguinte ao pico de LH ovulatório, já tem início uma pequena produção de P4 (SENGER 2003; FERREIRA,2010).

Período onde ocorre a ovulação, por volta de 24 a 48 horas contadas do início do cio. Com o início da produção rudimentar de P4, a genitália tende a ficar com menor tônus, menos vascularizada e edemaciada; termina quando o CL atinge sua plena capacidade de produção de P4.

### **2.3.3 Diestro**

Diestro é o período em que o CL está funcionalmente e ativo e produzindo P4. Esta fase vai do 5º ao 17º dia do CE (fase de maior duração) sendo a única em que se encontra CL e, portanto, a única em que pode haver resposta à PGF2 $\alpha$  (FERREIRA, 2010). Aproximadamente 70% - 80% das vacas ciclando podem ter CL responsivo à PGF2 $\alpha$ , em razão do CL ter menos receptores para este hormônio e, por isto, apresentar menor resposta (KASTELIC, 1997; FERREIRA, 2010)

A progesterona exerce um efeito de retroalimentação negativa sobre a secreção hipofisária de LH; conseqüentemente, durante o diestro, a secreção de LH é reduzida (RECEE, 2006). Sob ação da P4, o cérvix fecha, o útero fica mais flácido, com menor resistência imunológica (menos vascularizado) e maior atividade das glândulas.

### **2.3.4 Proestro**

Proestro é fase que tem início com a regressão e lise do CL (declínio de P4) e termina no início do cio, sendo caracterizada por uma grande transição endócrina por passar por período de dominância progesterônica para dominância estrogênica. Caracterizada pelo contínuo decréscimo dos níveis de FSH e aumento dos níveis de LH. Dura de 3 a 5 dias na vaca, período em que ocorre aumento gradativo dos níveis de E2, com pico no início do estro (FERREIRA, 2010).

## **3 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS**

A transferência de embriões (TE) é uma biotécnica que permite recolher embriões de uma fêmea doadora e transferi-los para fêmeas receptoras com a finalidade de completar o período de gestação (GONÇALVES et al., 2008).

Uma fêmea bovina (doadora) pode aumentar o número descendentes produzidos em sua vida concebendo repetidamente, recuperando os embriões no início da prenhez e transferindo-os para o trato reprodutivo de outras fêmeas (receptoras) para completar a gestação (HAFES e HAFES, 2004).

Para FERREIRA (2010), são considerados partes do processo de TE: o exame ginecológico das doadoras e das receptoras, o controle do CE e a sincronização do cio, a superovulação, a inseminação das doadoras, a coleta e o exame de embriões, a criopreservação e/ou a transferência desses embriões para as receptoras, até o diagnóstico de gestação.

A TE fornece a base técnica para viabilizar a implantação de outras biotécnicas, como a produção de clones e de animais transgênicos. Para o melhoramento genético ela é importante instrumento porque acelera e confere maior precisão no processo de seleção animal, podendo ser empregada para obter descendentes de fêmeas geneticamente superiores incapacitadas de levar uma gestação a término devido a distúrbios reprodutivos adquiridos sem caracterização genética (GONÇALVES et al., 2008).

### 3.1 PRINCÍPIOS DA SUPEROVULAÇÃO

O princípio da superovulação envolve fornecer à fêmea maior nível de FSH que o normal, para que mais folículos sejam selecionados e recrutados. A superovulação é usada na técnica de TE e consiste na estimulação hormonal dos ovários da fêmea bovina doadora de embriões, com objetivo de induzir o desenvolvimento e a maturação de vários folículos simultaneamente, de modo que, após a indução da luteólise, ocorram múltiplas ovulações durante o mesmo cio. A ovulação hormonal requer uma prematura luteólise (FERREIRA, 2010).

O tratamento superovulatório objetiva suprir a deficiência da concentração de FSH antes que o folículo dominante promova a redução da concentração endógena dessa gonodotrofina. Desse modo, os efeitos da dominância folicular são neutralizados, as divergências impedidas, e o desenvolvimento simultâneo de vários folículos com características fisiológicas semelhantes daqueles selecionados para ovularem, torna-se possível (GONÇALVES et al., 2008).

O hormônio superovulatório mais utilizado é o FSH, injetado via intramuscular profunda nas doadoras, a dose utilizada a cada administração pode variar de 18 a 50mg, dependendo da raça e da idade do animal. Os animais mais velhos podem requerer doses maiores do que as novilhas e os zebuínos doses menores do que raças europeias. O FSH possui meia-vida curta, sendo metabolizado mais rapidamente, produzindo menos efeitos indesejáveis e resultados mais consistentes na produção de embriões viáveis, mais apresentam a desvantagem da necessidade de aplicação a cada 12 horas (FERREIRA, 2010).

O maior problema da TE em bovinos é a diferente resposta das doadoras ao tratamento superovulatório. Segundo GONÇALVES et al., (2008) a alta variabilidade de resposta a teoria hormonal é decorrente de fatores relacionados ao ambiente, como nutrição, estabulação e temperatura ambiental, dentre outros, bem como a fatores inerentes à doadora, como idade, raça, genética, sensibilidade ao estresse e a produção de leite. Além disso, o tipo, o grau de pureza, o lote comercial e a atividade biológica da gonadotrofina, bem como o protocolo de superovulação empregado e as doses utilizadas também influenciam nos resultados.

### 3.2 CONTROLE SANITÁRIO

O manejo sanitário dos animais que são submetidos a trabalhos de TE, trata-se de exames, vacinações e controle de endo/ectoparasitas, para então reduzir a reabsorção de embriões ou perda embrionária, por algum tipo de estresse ou doenças reprodutivas, assim garantindo ao feto um ambiente saudável no útero da receptora para um bom desenvolvimento (SANTOS, 2011)

As doadoras devem ser oriundas de propriedades com rebanhos hígidos, sem qualquer relato, de pelo menos nos últimos seis meses, de caso clínico, infectocontagioso, como brucelose, tuberculose, leucose, dentre outros (GONÇALVES et al., 2008).

### 3.3 SELEÇÃO DAS DOADORAS

Um dos pontos críticos, devido a obrigatoriedade de se utilizar animais sem distúrbios reprodutivos, com ciclo estral regular e nutrição adequada (FIGURA 3). Antes de começar um tratamento hormonal para induzir a superovulação, é recomendável verificar a identificação correta da doadora (registro na associação de criadores à qual pertence) e coletar uma amostra de sangue, ou pelo do animal (geralmente da ponta da cauda), para tipificação e posterior comprovação da descendência. Nesse contexto, é necessário inseminar as doadoras somente com sêmen de touros tipificados (GONÇALVES et al., 2008).

Novilhas púberes devem ser incluídas num programa de TE desde que tenham peso corporal ideal se comparado ao seu peso de adulto e possuam trato reprodutivo com desenvolvimento anatômico e fisiológico que permitam realizar o procedimento.

A avaliação da doadora inclui os exames clínicos-geral e ginecológico para evitar a inclusão de animais com condições clínicas comprometidas, seja de ordem geral (alterações dos sistemas locomotor, digestivo, urinário e circulatório) ou específica do trato genital (alterações,

no útero, ovários e oviduto) no programa de TE. A inclusão de fêmeas num programa de TE nunca deve ser inferior a 60 dias de pós-parto, e devendo ser precedida de rigorosa observação da regularidade de, pelo menos, dois CE consecutivos (GONÇALVES et al., 2008).

Exames ultrassonográficos do trato reprodutivo são de grande importância para determinar se um animal está apto para reprodução, qual a fase do ciclo estral ou se apresenta alguma desordem do trato reprodutivo (GOUVEA, 2011)

Figura 3 - Doadoras de embriões da raça Charolês da Fazenda Butiá Verde.



Fonte: Arquivo pessoal (2018)

### 3.4 SELEÇÃO DAS RECEPTORAS

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 pode ser crítico para o êxito de TE. As novilhas e as fêmeas múltíparas que apresentem ciclo estral regular, que tenham parido há no mínimo 60 dias, que o puerpério tenha decorrido normalmente e que estejam livres de doenças e anomalias do trato reprodutivo podem ser selecionadas como receptoras de embriões (GONÇALVES et al., 2008).

Para serem selecionadas como receptoras as fêmeas devem apresentar atividade cíclica regular, e quando se tratar de primíparas e pluríparas que estejam paridas há mais de 60 dias;

que o puerpério tenha transcorrido normalmente e que estejam livres de doenças ou anomalias do trato reprodutivo (WILLIAMS, 2001).

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 ser capaz de produzir leite suficiente para amamentar e permitir que a cria se desenvolva normalmente (GONÇALVES et al., 2008).

Figura 4 - Lote de receptoras da Fazenda Butiá Verde.



Fonte: Arquivo pessoal (2018)

Para SCARPELLI (2003), o ideal é que sejam aproveitadas fêmeas oriundas da mesma propriedade em razão de se conhecer o histórico reprodutivo de cada indivíduo (FIGURA 4). Todavia, na necessidade de se comprar fêmeas destinadas a receptoras, deve-se ter a precaução de adquirir fêmeas com cria ao pé ou novilhas em bom estado de desenvolvimento corporal e com ciclo estral regular.

Segundo FERNANDES (2005), o estado de condição corporal da fêmea bovina pode reduzir o desenvolvimento do concepto. A principal fase na qual a nutrição pode afetar o desenvolvimento é no início da gestação, sendo esse efeito particularmente delicado até o reconhecimento materno da gestação, que ocorre entre 17 e 25 dias após a concepção.

De forma geral, uma doadora produz, em média, quatro a cinco embriões de boa qualidade em cada coleta. Em consequência, aproximadamente 10 receptoras deverão ser preparadas (sincronização do cio) para obter aproximadamente seis receptoras (sincronizadas com o cio da doadora) aptas para receber um embrião (ALVAREZ, 2009).

A seleção final de uma fêmea como receptora de embriões somente deve ocorrer no dia da transferência em função, principalmente, dos sintomas de estro evidenciados após a sincronização e da avaliação do CL cíclico (GONÇALVES et al., 2008).

### 3.5 CONTROLE E SINCRONIZAÇÃO DO CICLO ESTRAL DAS DOADORAS E RECEPTORAS

A sincronização de cio deve ser realizada tanto na doadora quanto na receptora para que o embrião se implante na receptora em torno do mesmo período que foi retirado da doadora (pode haver flexibilidade de mais ou menos um dia de sincronia entre doadora e receptora). Por exemplo, embriões que forem coletados 7 dias após o estro ou indução da ovulação nas doadoras podem ser transferidos em receptoras que estejam entre os dias 6 e 8 do ciclo estral. Esta regra aplica-se tanto para embriões transferidos a fresco, quanto para embriões congelados. As vacas que já serviram como receptoras de embrião e estão aumentando o produto desta TE podem ser receptoras novamente, contanto que estejam em boas condições corporais e no mínimo com 50 a 60 dias pós o parto (SEIDEL, 1981).

#### 3.5.1 Superovulação das doadoras

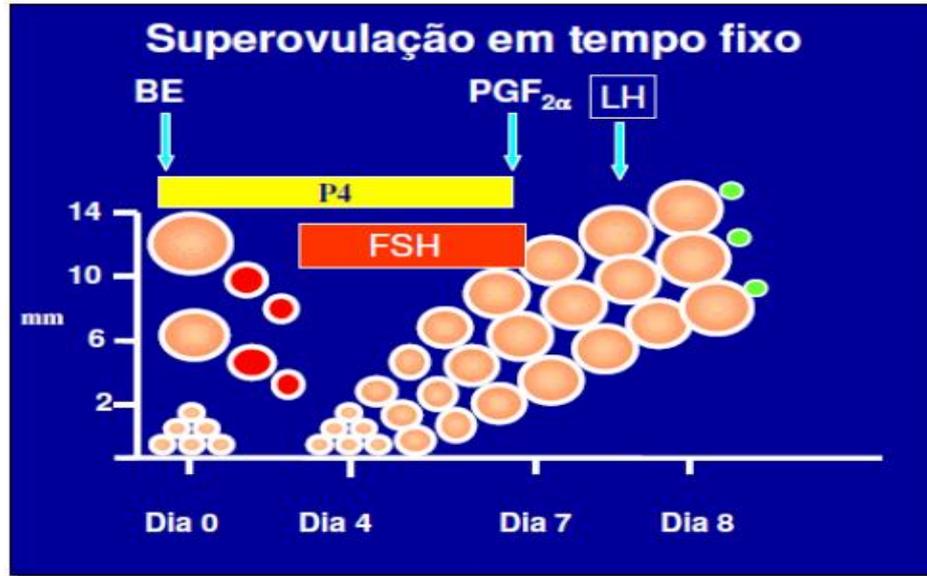
O tratamento superovulatório deve ser realizado no começo de uma onda folicular, antes da seleção do folículo dominante, para se obter a melhor resposta possível e desejável (GONÇALVES et al., 2001).

Os principais tratamentos superovulatórios tradicionais consistiam de uma única administração de gonadotrofina coriônica equina (eCG) ou duas injeções diárias de extratos de FSH da pituitária por 4 ou 5 dias (BÓ et al., 2012 a). Segundo GONÇALVES et al., (2010) também pode ser empregada a gonadotrofina menopáusicica humana (hMG) mas seu custo praticamente inviabiliza o tratamento.

Segundo SANTOS (2011), os protocolos de sincronização e superovulação usados atualmente são baseados em dispositivos que liberam progesterona combinados com estradiol ou GnRH e FSH, que controlam a dinâmica das ondas foliculares e a ovulação

O FSH é a gonadotrofina mais utilizada na SOV de bovinos na atualidade (FIGURA 5), maioria dos protocolos indica 8 aplicações durante 4 dias consecutivos, em doses decrescentes, duas vezes ao dia com intervalo de 12 horas devido a sua vida média ser relativamente menor se comparada a eCG.

Figura 5 - Desenho esquemático da ação hormonal durante processo de superovulação em bovinos.



Fonte: TECNOPEC (2010)

### 3.5.2 Sincronização das receptoras

A sincronização entre o estágio de desenvolvimento do embrião e o trato reprodutivo da receptora se torna um pré-requisito obrigatório, que se consegue pela seleção de receptoras que estavam em cio ao mesmo tempo que a doadora, seja naturalmente ou como resultado da sincronização do cio. Para resultados ótimos, a receptora deve estar em cio dentro de um prazo de 12 horas em relação à doadora. As taxas de prenhez caem drasticamente se a diferença ultrapassar 24 horas (HAFEZ e HAFEZ, 2004)

Segundo VALENTIM e GOFERT (2004), existem várias técnicas de controle do ciclo estral para sincronização de receptoras, dos mais antigos, à base de prostaglandina, aos mais modernos protocolos, que utilizam o conceito de sincronização do crescimento folicular e da ovulação.

Segundo GONÇALVES et al., (2008), para a sincronização do estro em doadoras e receptoras, durante o tratamento superovulatório, recomenda-se administrar a prostaglandina nas receptoras, 12h antes do momento da aplicação nas doadoras. Tal recomendação deve-se ao fato das doadoras mostrarem sinais de estro mais rapidamente do que as receptoras devido à influência do tratamento superovulatório.

A associação entre dispositivos de progesterona e estradiol são os tratamentos mais comumente usados para sincronizar emergência de onda folicular e ovulação em receptoras de corte e leite na América do Sul (BÓ et al., 2012 b). O protocolo consiste da inserção de um

dispositivo liberador de progesterona e a administração de 2mg de benzoato de estradiol no dia 0 (para sincronizar a emergência de onda folicular), e PGF $2\alpha$  5 dias depois do momento da inserção do dispositivo de progesterona (para garantir a luteólise). O dispositivo de progesterona geralmente é removido no dia 8 e a ovulação é induzida pela administração de 0,5 ou 1mg de benzoato de estradiol 24h após a remoção do dispositivo de progesterona. Como nos programas de TETF a detecção do estro geralmente não é realizada, o dia 10 é considerado o dia do estro. Todas as receptoras com CL aparentemente funcional no dia 17 recebem um embrião (BÓ et al., 2012 b).

A estratégia mais comum usada para aumentar a proporção de receptoras gestantes sobre o número de fêmeas sincronizadas em bovinos de corte mantidos a pasto na América do Sul é adição de 400 UI de eCG no dia 5 ou no dia 8 do protocolo de sincronização que utiliza a associação de estradiol e progesterona. Este fármaco proporciona uma maior concentração de progesterona durante a fase lútea subsequente, pela qualidade do CL formado (MARINHO et al., 2012).

### 3.6 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL DAS DOADORAS

Segundo GONÇALVES et al. (2008), existem dois esquemas básicos para inseminação da doadora. O primeiro consiste em inseminar a fêmea tornando como base a detecção e a ocorrência do estro superovulatório. Neste caso o estro decorrente da superovulação pode ser identificado, em média, de 48 a 72 horas após o tratamento com um agente luteolítico. As doadoras são inseminadas de duas a três vezes durante o estro, sendo que a primeira IA deve ser efetuada a partir do momento em que a doadora mostra os primeiros sinais de estro e as seguintes em intervalos de 8 a 12 horas após a primeira IA.

A segunda possibilidade é inseminar a doadora independente da detecção desse estro superovulatório, ou seja, a inseminação artificial é realizada em tempo fixo (IATF), neste protocolo é possível controlar o momento das ovulações através da administração exógena de LH (GONÇALVES et al., 2010).

### 3.7 COLHEITA DE EMBRIÕES

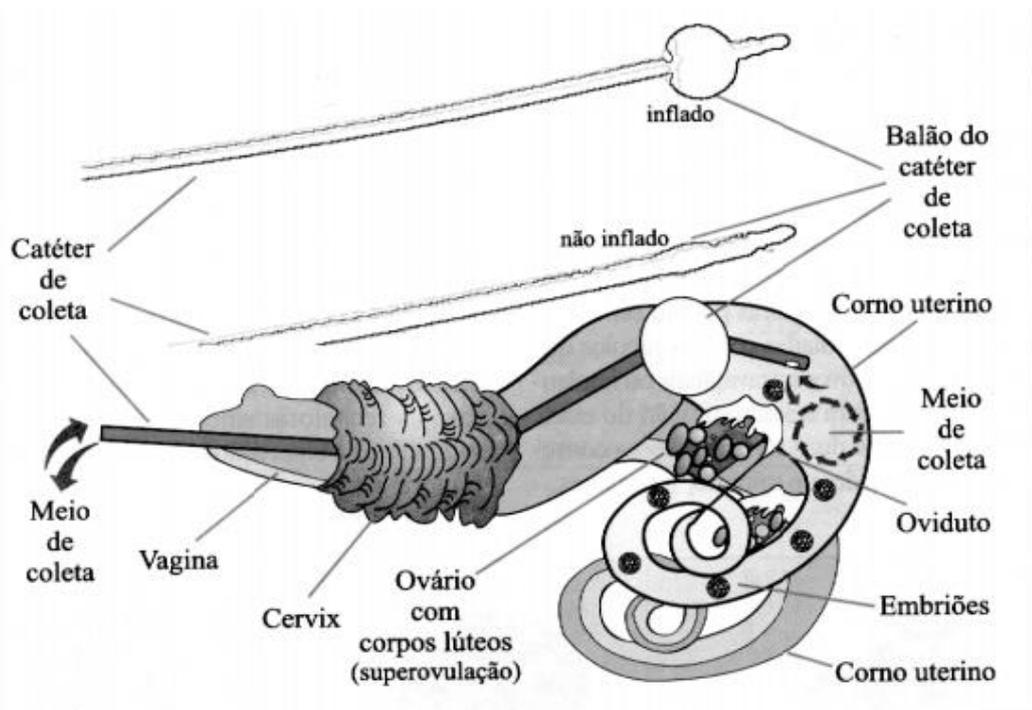
A colheita de embriões é realizada preferencialmente, entre o sexto e oitavo dia após a primeira inseminação das doadoras. Nesse período o embrião encontra-se flutuando, num filme

líquido no lúmen ápice dos cornos uterinos. Isso permite sua captação através da técnica de lavagem dos cornos uterinos (DEMÉTRIO, 2003).

O método mais utilizado é o transcervical com o sistema fechado de coleta, este método (FIGURA 6), o meio de lavagem introduzido no corno uterino é recolhido através de um sistema composto por dois tubos de plástico flexíveis, sendo que um é o recipiente contendo o meio de coleta e o outro, um filtro para a obtenção dos embriões. Esse meio de coleta deve fluir por gravidade através do tubo acoplado ao recipiente, bem como através do cateter em direção ao corno uterino, sendo necessário que o recipiente seja posicionado cerca de um metro acima da garupa do animal (REICHENBACH et al., 2002).

Para realização da técnica o animal deve estar devidamente contido, evitando riscos tanto para o animal, quanto para o operador. Deve ser feita a correta higienização da vulva, ânus e inserção da calda, em seguida faz-se a anestesia epidural, para promover relaxamento do reto e útero, facilitando a passagem da sonda (cateter de foley) através da cérvix, inflando-se o balão localizado na extremidade da sonda com cerca de 10 a 20mL de ar, para fixação da mesma. Inicialmente colocamos um mandril de metal no lúmen da sonda para torna-la rígida (SANTOS, 2011).

Figura 6 – Desenho esquemático de lavagem uterina e colheita de embriões



Fonte: GUIDO, (2005)

Após o posicionamento do cateter em um dos cornos, o balão é inflado, o corno uterino é preenchido com 30 a 60 ml de meio PBS aquecido (30°C), permitindo-se a sua passagem para um recipiente de coleta (filtro), enquanto o útero é delicadamente massageado pelo reto. Isso é repetido até que 300 a 800 ml de meio tenham sido usados. O cateter de Foley é, então, inserido no outro corno uterino e o processo é repetido (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Segundo GAMBARINI (2004), após a lavagem, o balão é desinflado e a sonda é retirada. Ao término de cada coleta recomenda-se a aplicação de PGF2 $\alpha$  para se evitar gestação indesejada.

### 3.8 BUSCA E CLASSIFICAÇÃO EMBRIONÁRIA

Logo após a colheita, o filtro é lavado por jatos de PBS até ficar limpo e livre de muco na tela filtrante, e a fração do lavado uterino é transferida para placas de Petri estéreis de 100 x 20 mm. A procura dos embriões é feita com auxílio do estereomicroscópio binocular no aumento de 15 vezes. (WÜNSCHE JÚNIOR et al., 2008). Em outra placa menor (3 cm de diâmetro), coloca-se uma das soluções de manutenção existentes, que podem ser compostas de PBS (líquido de coleta) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), PBS com 0,4% de Albumina Bovina (BSA), ou ainda soluções prontas como meio Holding (FERNANDES, 2001).

Após a seleção dos embriões viáveis para transferência ou congelamento estes devem ser lavados em 10 gotas de meio holding (manutenção) de volume tal que permita uma diluição de 100 x em relação à gota precedente (SANTOS, 2011)

Segundo GONÇALVES et al. (2008), a qualidade do embrião é o fator que mais influencia os resultados de prenhez da TE. Existe uma relação entre as características morfológicas e estruturais de embriões bovinos de diferentes qualidades e capacidade de desenvolvimento dos embriões após transferência (TABELA 1).

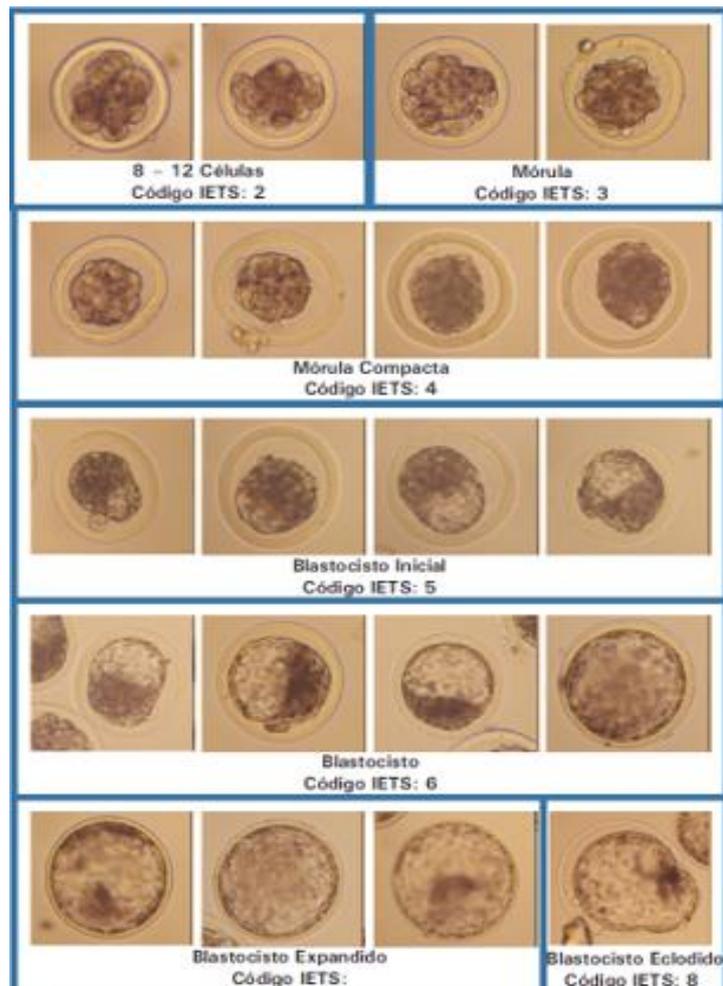
A Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) normatizou os critérios para classificação morfológica de embriões bovinos produzidos in vivo quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade (VIANA, 2012). Essa classificação foi esquematizada por GUIDO (2005) e está apresentada na FIGURA 7.

Tabela 1 - Classificação dos embriões segundo a qualidade.

Classificação	Características morfológicas
<b>I (excelente ou bom)</b>	Embriões simétricos e esféricos, com blastômeros apresentando tamanho, coloração e densidade uniformes. Presença de poucas células de extrusão no espaço perivitelínico, com cerca de 85% do material celular intacto
<b>II (regular)</b>	Embriões apresentando irregularidades moderadas no formato ou tamanho, na cor e densidade dos blastômeros. No mínimo 50% do material celular devem estar intactos
<b>III (pobre)</b>	Grandes irregularidades no formato ou tamanho do embrião, com alterações evidentes na coloração e densidade dos blastômeros. No mínimo 25% do material celular devem estar intactos
<b>IV (degenerado ou não fecundado)</b>	Sem forma definida, com estágio de desenvolvimento pouco evidente e grande desorganização celular ou oócitos não fecundados.

Fonte: Manual de transferência e Micromanipulação de embriões nas espécies Bovina e Equina.

FIGURA 7 - Estágios de desenvolvimento embrionário, considerando-se os estágios de desenvolvimento bem como os códigos recomendados pela IETS.



Fonte: STRINGFELLOW (1998)

### 3.9 INOVULAÇÃO

Segundo RUMPF et. al. (2003), inovulação consiste na deposição do embrião no útero de uma fêmea receptora, onde a inovulação transcervical deve seguir os seguintes passos: conter bem o animal, avaliação do ovário contendo CL, realizar anestesia epidural, introdução no corno uterino delicadamente, deposição do embrião o mais próximo da junção útero-tubárica.

Somente embriões classificados de 1 a 3 devem ser transferidos para receptoras. Antes da transferência, o embrião precisa ser acomodado no centro de uma palheta contendo meio de cultivo. O envasamento da palheta é feito de tal forma que uma coluna central contendo o embrião encontra-se separada das colunas nas extremidades por duas colunas de ar. As palhetas precisam ser devidamente identificadas para evitar equívocos no momento da transferência (GONÇALVES et al., 2008).

Sob condições assépticas, a palheta contendo o embrião é encaixada em um aplicador (inovulador) revestida por uma bainha estéril e uma camisa sanitária, em seguida é introduzida via transcervical (na entrada da cérvix se rompe a camisa sanitária), e por manipulação retal é guiada até o corno uterino ipsilateral do corpo lúteo cíclico, onde finalmente o líquido contendo o embrião é depositado (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Realizou-se na Fazenda Butiá Verde, município de Fraiburgo um protocolo de transferência de embriões em tempo fixo durante os meses de janeiro e fevereiro de 2018. Para isso foram selecionadas 3 doadoras da raça Charolês PO, sendo que todas foram coletadas e seus embriões transferidos a fresco no dia 11 de fevereiro de 2018 para fêmeas mestiças simental, para isso foram selecionadas e sincronizadas um plantel de dez vacas.

A escolha das doadoras foi baseada em alguns critérios com pedigree consistente, premiação em pista, produção de descendentes com potencial genético superior, possuir beleza caracterização racial, boa resposta a tratamento hormonal anterior. Os animais apresentavam escore corporal aproximado de 3,5 a 4 numa escala de 1 a 5, não tinha sofrido nenhuma enfermidade nos últimos meses e não tinham histórico de problemas reprodutivos, estavam a pelo menos seis meses na propriedade. Antes do início do protocolo de superovulação estavam

sendo alimentadas a pasto e com suplementação mineral no cocho com Fosbovi® Reprodução para potencializar a aptidão reprodutiva.

Figura 8 – Doadora da Fazenda Butiá Verde momentos antes da colheita de embriões.



Fonte: Arquivo pessoal (2018)

As fêmeas selecionadas para receptoras possuíam entre seis e nove anos, tinham um escore corporal adequado, eram nativas da mesma propriedade, não tinham histórico de doença reprodutiva e sistêmica e também não apresentaram alterações no exame ginecológico prévio à seleção, facilidade de parto e boa aptidão materna, eram alimentadas a pasto e também com suplemento mineral no cocho com Fosbovi® Reprodução.

A escolha dos touros também se deu de forma bastante criteriosa, foram selecionados o sêmen de dois touros reconhecidamente superiores com excelentes DEP's para facilidade de parto direto, peso ao nascer e boa fertilidade. A compra foi de empresas de reconhecida credibilidade nacional na área da reprodução bovina, e após o recebimento foram acondicionados na Fazenda em botijão criogênico com adequado nível de nitrogênio líquido.

O início do protocolo de superovulação teve início no dia 25 de janeiro de 2018 sendo representado na tabela 2 como o dia zero e a coleta e inovulação dos embriões realizou-se no dia 11 de fevereiro de 2018 representando o 17º dia do protocolo hormonal. Os hormônios empregados em cada dia, bem como suas doses também são apresentados na tabela 2.

Os hormônios utilizados neste protocolo de superovulação estão descritos na literatura como os ideais para o que se alcance uma resposta desejada. No dia 0 do protocolo foram colocados os implantes intravaginais de progesterona nas fêmeas doadoras (Sincrogest<sup>®</sup>), segundo NICASIO (2017) a função da P4 exógena é sensibilizar o sistema reprodutivo e provocar a atresia de folículos, com conseqüente emergência de nova onda de crescimento folicular ou retirar do anestro animais que não estiverem ciclando; a remoção do implante no dia 8 visa a ovulação, estimulada pela queda abrupta dos índices de P4 plasmática. Também no dia 0 ocorreu a aplicação de benzoato de estradiol (Sincrodiol<sup>®</sup>) na dose de 2mg/animal, segundo NICASIO (2017) o benzoato de estradiol age concomitantemente com a P4 para provocar a atresia folicular e o recrutamento de nova onda de crescimento por volta do dia 4 e 5 do protocolo, aumentando a sincronização do estro pelo aumento do pico de LH.

A partir dia 5 até o dia 8 foi realizado a suplementação de FSH através da injeção intramuscular de Folltropin-v<sup>®</sup>, as aplicações foram realizadas em oito doses decrescentes com intervalo de doze horas devido a meia vida curta deste hormônio com já destacado anteriormente na revisão de literatura, as doses iniciais são mais altas e vão decrescendo durante os quatro dias de tratamento iniciando com 140mg diário por animal no dia 5 e terminando com 20mg diário por animal no dia 8.

Segundo MIZUTA (2003) o Folltropin-v<sup>®</sup> é um produto à base de Hormônio Folículo Estimulante (FSH) purificado (84% FSH: 16% LH), extraído de pituitárias (hipófises) de suínos abatidos para alimentação humana. Sua principal atividade é estimular o crescimento folicular nos ovários agindo através de receptores específicos.

No dia 8 do protocolo as doadoras receberam duas doses de D- cloprostenol (Croniben<sup>®</sup>) por via intramuscular com intervalo de 12 horas entre doses, este hormônio é um análogo sintético de PGF<sub>2α</sub>, apresenta uma meia-vida cerca de 23 vezes maior que a PGF<sub>2α</sub> natural, de aproximadamente 3 horas contra 8 minutos (MC CRACKEN et al., 1999) é muito mais potente do que a PGF<sub>2α</sub> uma vez que não é degradado pelas enzimas 15-hydroxydehydrogenase e 13,14-redutase (BOURNE, 1981). Devido a essas características, o d-cloprostenol é usado em medicina veterinária como um agente luteolítico para a indução de cio e o tratamento de desordens reprodutivas das diversas espécies de interesse zootécnico.

No dia 9 do protocolo foi administrado no período da manhã por via intramuscular profunda Acetato de buserelina (Sincroforte<sup>®</sup>) na dose de 0,017 mg/animal, que é um hormônio sintético análogo ao GnRH. Segundo NICASIO (2017) o GnRH melhora a eficiência da

sincronização por potencializar o pico de LH e promove a ovulação em aproximadamente 24 horas.

A primeira IA das doadoras foi realizada no dia 10, de manhã, cerca de 48 horas da aplicação de GnRH, e a segunda foi realizada aproximadamente doze horas depois.

Tabela 2 – Protocolo hormonal de superovulação utilizado pelo médico veterinário Mailton Rafael Wolfart para vacas doadoras de embriões da Fazenda Butiá Verde.

<b>Dose total de FSH (Folltropin<sup>1</sup>)</b> 14ml ou 280mg de FSH (Folltropin)		
<u>Dia</u>	<u>Manhã</u>	<u>Tarde</u>
0	P4+2ml de BE	
5	3,5ml FSH (25%)	3,5ml FSH (25%)
6	2ml FSH (14,3%)	2ml FSH (14,3%)
7	1ml FSH (7,15%)	1ml FSH (7,15%)
8	0,5ml FSH (3,55%) Remoção de P4 2ml de D - cloprostenol	0,5ml FSH (3,55%) 2ml de D - cloprostenol
9	4ml GnRH Observação de cio	Observação de cio
10	IA	IA
17	Coleta de embriões 2ml de D - cloprostenol	

A sincronização de cio deve ser realizada tanto na doadora quanto na receptora para que o embrião se implante na receptora em torno do mesmo período que foi retirado da doadora (pode haver flexibilidade de mais ou menos um dia de sincronia entre doadora e receptora). Por exemplo, embriões que forem coletados 7 dias após o estro ou indução da ovulação nas doadoras podem ser transferidos em receptoras que estejam entre os dias 6 e 8 do ciclo (GONÇALVES et al., 2008). O protocolo de sincronização das receptoras foi iniciado juntamente com as doadoras, estando demonstrado na tabela 3 os hormônios e doses utilizadas.

<sup>1</sup> Folltropin ® -V – Extrato purificado de glândulas pituitárias suína, Vetoquinol Saúde Animal Ltda.

Tabela 3 – Protocolo de sincronização das receptoras implantado pelo médico veterinário Mailton Rafael Wolfart na Fazenda Butiá Verde.

<b>Protocolo para receptoras</b>		
<u>Dia</u>	<u>Manhã</u>	<u>Tarde</u>
0	P4 2ml de BE 1,5 ml de PGF <sub>2α</sub> (D cloprostenol)	
8	Remoção de P4 2ml de PGF <sub>2α</sub> (D cloprostenol) 1,5ml de eCG 0,3 ml de Cipionato de estradiol	
9	Observação de cio	Observação de cio
10	Observação de cio	Observação de cio
17	TE 1ml GnRH (Acetato de busarelina )	

Na manhã do dia 11 de fevereiro foi iniciado na Fazenda Butiá Verde o procedimento de coleta de embriões, toda a coordenação e organização das atividades se deu sob responsabilidade do médico veterinário Mailton Rafael Wolfart. Inicialmente foi realizada a organização dos materiais e equipamentos, sendo optado pelo sistema de coleta transcervical fechado não cirúrgico, sendo que os instrumentos utilizados foram os seguintes:

- Seringas e agulhas para aplicação dos hormônios e anestésicos;
- Luvas de procedimentos e palpação retal;
- Anestésico local anestesia epidural das doadoras e receptoras;
- Cateter de foley;
- Mandril para introdução do cateter de foley;
- Equipo para sistema fechado de lavagem uterina;

- Bolsa de 1000ml de solução PBS (tampão fosfato salino), para lavagem do útero;
- Copo coletor de embriões que vai acoplado no final do sistema fechado de lavagem;
- Placas de Petri;
- Estereomicroscópio (lupa) com zoom;
- Micropipeta e ponteiras;
- Meio *holding*, soro fetal bovino (SFB);
- Palhetas 0,25mm para envase de embriões;
- Aplicadores específicos para inovulação de embriões;
- Bainha para aplicador e camisinha sanitária;
- Filtro com poros de 0,22 $\mu$ ;
- Papel toalha;
- Caneta para escrita;
- Álcool 70%;
- Fichas de anotações;
- Aparelho de ultrassom;

Figura 9 - Materiais utilizados no procedimento TE de embriões na Fazenda Butiá Verde.



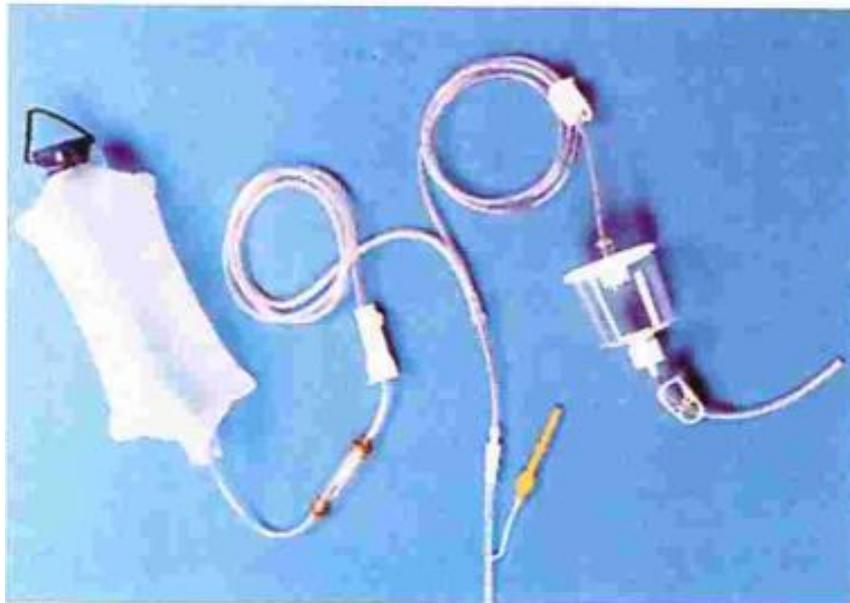
Fonte: Arquivo pessoal (2018)

A Fazenda dispõe de estrutura básica para um laboratório, com boa iluminação e uma geladeira para o armazenamento de medicamentos durante as aplicações hormonais; também dispõe de uma estrutura excelente para que os animais sejam medicados e manipulados de forma segura e eficiente, composto de conjuntos de mangueiras de apartação e um moderno tronco de contenção.

A manipulação das doadoras de embriões foi iniciada com a devida contenção no tronco, procedeu-se a esvaziamento do reto, higienização da vulva e região perianal, em seguida foi realizada uma avaliação ultrassonográfica para se ter uma ideia da resposta superovulatória, e posteriormente foi realizada anestesia epidural baixa com 5ml de cloridrato de lidocaína a 2%.

Antes da introdução da sonda de foley a mesma foi enxaguada com PBS, e feita a montagem com a introdução do mandril no seu interior para diminuir a flexibilidade e então introduzida na vulva. Depois de transpassada a cérvix, foi feita a retirada do mandril, e após o correto posicionamento do cateter em um dos cornos uterinos o balão da sonda é inflado com 20 ml de ar, ocorrendo à obstrução da cérvix. Como o sistema de coleta adotado foi o fechado, após o posicionamento da sonda de Foley, foi encaixado o tubo Y onde em uma das extremidades acoplava-se o filtro coletor.

Figura 10 - sistema fechado de coleta de embriões.



Fonte: Gonçalves (2008)

O meio PBS foi aquecido e a bolsa continente colocada em balde com água à temperatura de 36 C° até o momento de ser acoplado a outar extremidade do y, após é colocada em uma altura de mais ou menos 50 cm da garupa da vaca para que a solução desça pelo tubo até o corno uterino por gravidade. A lavagem é realizada com pequenos volumes de meio, fazendo suave massagem com a ponta dos dedos no corno uterinos em seguida o liquido de lavagem passava pelo filtro coletor ficando retidos os embriões com 20-30 ml de PBS, foi usado aproximadamente 800ml de meio de lavagem no primeiro corno, em seguida a operação foi repetida no outro, e após encerrada a lavagem o filtro seguiu para o laboratório. Antes de ser liberada do tronco de contenção a receptora recebeu uma dose de D- cloprostenol (Croniben ®) um hormônio análogo PGF<sub>2α</sub> no intuito de fazer a lise do corpo lúteo evitando uma possível prenhez gemelar.

Figura 11 - Procedimento de lavagem uterina para coleta de embriões.



Fonte: Arquivo pessoal (2018)

Logo após a coleta, o filtro foi lavado por jatos de PBS seringa de 20 ml até ficar limpo e livre de muco na tela filtrante, a fração do lavado uterino foi transferida para placas de Petri estéreis de 100 x 20 mm (FIGURA 12). A procura dos embriões foi realizada com auxílio do estereomicroscópio (FIGURA 13) e as estruturas obtidas são transferidas para placas de Petri de 35 x 10 mm e mantidas em meio *holding* de manutenção para posterior avaliação e classificação.

Figura 12 - conteúdo de lavagem uterina contendo embriões depositado em placa de Petri.



Fonte: Arquivo pessoal (2018)

Figura 13 - Reconhecimento e classificação dos embriões com auxílio de estereomicroscópio.



Fonte: Arquivo Pessoal (2018)

Os embriões foram avaliados conforme a classificação da IETS, após avaliação e lavagem, todos os embriões viáveis foram envasados em palhetas 0,25 ml e a palheta foi preenchida da seguinte forma: primeiro se aspira uma coluna de meio de manutenção, deixa-se uma coluna com ar, logo se carrega o embrião com meio de manutenção, posteriormente a segunda coluna com ar e a última novamente com o meio. A palheta que continha o embrião foi identificada com o nome da doadora e qualidade do embrião, em seguida foram montados e identificados os aplicadores, colocação de camisa sanitária revestindo os aplicadores (FIGURA 14).

Figura 14 – Palheta contendo o embrião para ser inovulado e inovulador já montado revestido por camisa sanitária



Fonte: Arquivo pessoal (2018).

Antes da inovulação dos embriões foi realizado anestesia epidural baixa com 2,5 ml de lidocaína sem vaso constritor nas fêmeas receptoras, seguida de avaliação ultrassonográfica visualizando em qual ovário se encontrava o corpo lúteo cíclico e em seguida era procedido a transferência para as fêmeas que estavam aptas a receber. Após a inovulação aplicava-se a dose de 1 ml de um análogo de GnRH (Acetato de busserelina - Sincroforte<sup>®</sup>) em cada receptora utilizada para que se evite a ação de um folículo dominante, potencializando a ação da progesterona.

Segundo DREW e PETERS (1994) a aplicação de um análogo de GnRH em receptoras de embrião poderia manter os níveis de progesterona elevados, com o intuito de evitar mortes embrionárias prematuras, prevenindo assim a ação luteolítica da PGF<sub>2α</sub>, e proporcionando tempo para as citocinas trofoblásticas atuarem no reconhecimento materno da gestação.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tradicionalmente a pecuária catarinense tem a raça Charolesa como uma das prediletas e isso se deve a uma série de fatores, um deles é a maior capacidade de adaptação a qualquer tipo de forragem, também por que os animais dessa raça apresentam boa conversão alimentar, bom em ganho de peso e possuem excelente conformação e rendimento de carcaça; são os bovinos da raça europeia mais difundidos em nosso estado e mesmo com a introdução de novas raças, não perdem seu prestígio e valor. As entradas de novas biotecnologias fazem trazer junto o aprimoramento da raça, e esses animais, por possuírem ótimo desempenho, fazem com que os criadores solicitem mais trabalhos no âmbito das transferências de embriões e outras biotécnicas reprodutivas.

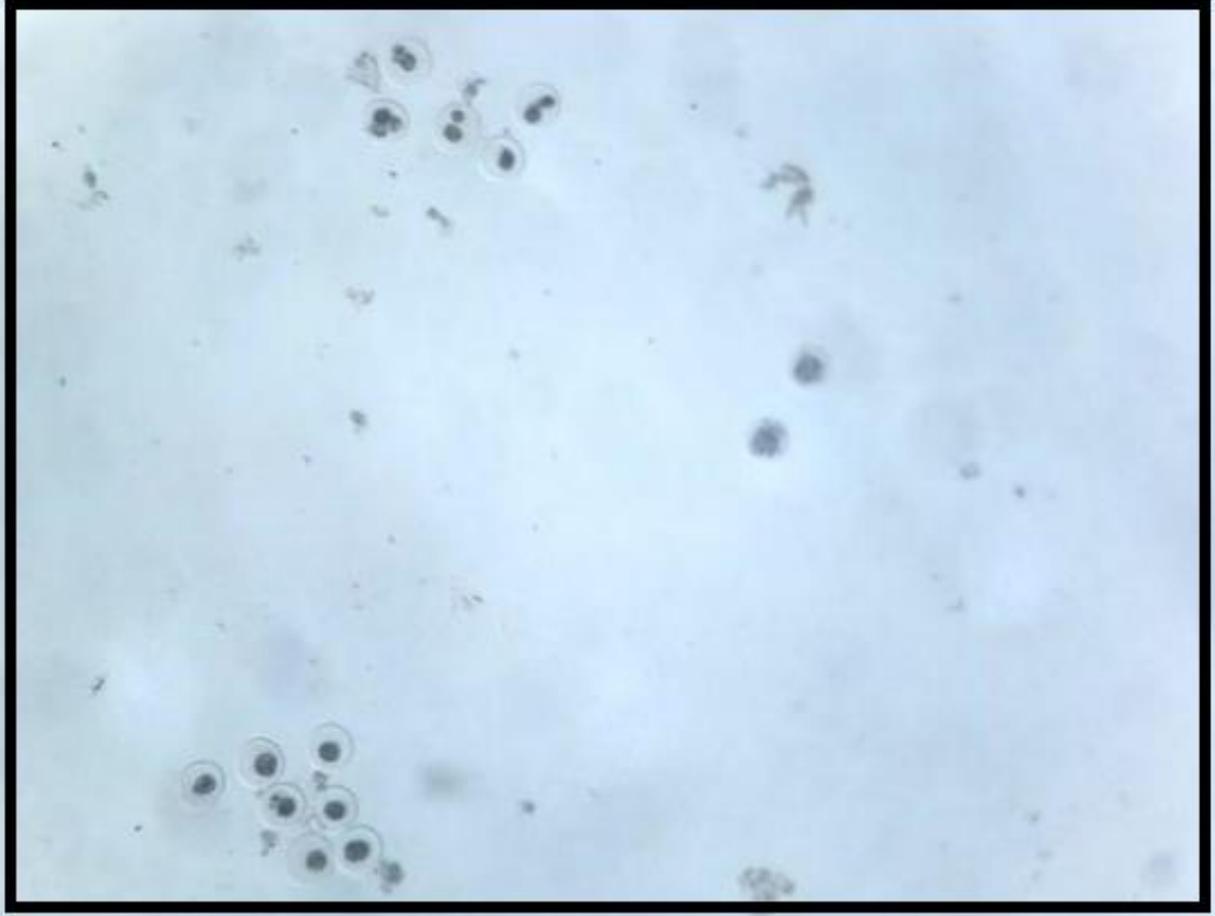
Com relação ao protocolo relatado, observou-se que à resposta a superovulação foi variável considerando as três doadoras. Da doadora D1 foi possível a obtenção de 5 embriões sendo que três foram classificados quanto ao estágio de desenvolvimento como blastocisto expandido, com marcada expansão da blastocele e conseqüente redução na espessura da zona pelúcida, classificado segundo a IETS como código 7; um classificado como blastocisto inicial de código IETS 6, e um foi classificado como mórula, código IETS 3. Da doadora D2 foi possível a obtenção de 14 estruturas embrionárias, porém destas estruturas apenas duas foram classificadas como mórulas, o restante tratava-se de embriões degenerados ou não fecundadas. A doadora D3 não apresentou resposta a estimulação hormonal para superovulação e dela não foi possível coletar nenhuma estrutura embrionária.

Figura 15 - embriões obtidos da doadora D1



Fonte: Arquivo pessoal (2018).

Figura 16 - embriões obtidos da doadora D2



Fonte: Arquivo pessoal (2018).

A proporção de embriões viáveis coletados considerando teóricos da área pode ser considerada baixa. Segundo FERREIRA (2010), uma típica resposta superovulatória em vacas seria de 8-10 ovulações com 5-7 embriões viáveis. Entretanto, 30% das vacas respondem produzindo apenas um ou nenhum embrião viável, enquanto cerca de 2% produzem muitos embriões (30 ou mais).

As razões fisiológicas para esta ampla variação na resposta ovariana à hiperestimulação não é conhecida. Para RUMPF et al. (2003), essa variação do número de embriões após tratamentos superovulatórios, tem sido atribuído a fatores individuais, mesmo sendo tratadas com dietas iguais, vivendo em um mesmo ambiente e utilizando tratamentos hormonais idênticos, obtiveram respostas altamente variáveis. Outro ponto também que se faz importante destacar é que animais *Bos taurus* tem menor resposta a este tipo de tratamento hormonal se compararmos a animais *Bos Indicus*.

No total foram considerados aptos para serem transferidos as receptoras sete embriões, como havia dez fêmeas sincronizadas para potencialmente se tornarem receptoras foi possível se fazer uma seleção daquelas que possuíam melhor conformação do CL através de do uso de ultrassonografia e a deposição do embrião no corno uterino corresponde ao CL. Considerando pesquisas anteriores é possível que o número de receptoras não era adequado considerando que as transferências seriam todas a fresco uma vez que na Fazenda não havia aparelho para criopreservação dos embriões que eventualmente viessem a sobrar.

Segundo FERNANDES et, al. (2006) sem a utilização do congelamento de embriões e assumindo-se que embriões coletados em excesso são perdidos, o mínimo custo de prenhez seria atingido com 14,7 receptoras por doadora. Para ALVAREZ (2009), uma doadora produz, em média, quatro a cinco embriões de boa qualidade em cada coleta. Em consequência, aproximadamente 10 receptoras deverão ser preparadas (sincronização do cio) para obter aproximadamente seis receptoras (sincronizadas com o cio da doadora) aptas para receber um embrião.

O diagnóstico de gestação das vacas que receberam embriões foi realizado após 40 dias da transferência através de ultrassonografia transretal, sendo que das cinco receptoras que receberam embriões da doadora D1, quatro confirmaram prenhez e das duas receptoras que haviam recebido embriões da doadora D2, uma teve prenhez confirmada. Novo exame ultrassonográfico foi realizado aos 90 dias de gestação foi realizado e constatou-se que as sete prenhes estavam mantidas até aquela data.

Apesar do presente trabalho não ter muita significância estatística devido ao tamanho reduzido da amostra, a inovulação mesmo feita em condições práticas de Fazenda atingiu uma taxa de prenhez de 57,14 %, representando uma satisfatória taxa de prenhez ao se comparar com relatos de Diniz e Jacomini (1995), igualmente trabalhando com *Bos taurus taurus*.

## 6 CONCLUSÃO

A técnica de Transferência de Embriões tem grande importância e vem ganhando cada vez mais espaço no mercado mundial. A demanda potencial do Brasil é enorme, e para supri-la, é necessário que haja cada vez mais médicos veterinários capacitados para operacionalizar esta biotecnologia. O processo de TE relatado no trabalho apresentou resultados satisfatórios muito em função do comprometimento e eficiência dos profissionais envolvidos, desde os funcionários da Fazenda Butiá Verde, mas principalmente do médico veterinário responsável.

A resposta à superovulação foi variável e, uma fêmea doadora não apresentou reação ao estímulo hormonal, isso pode ter variadas causas, mas servirá para orientar as coletas futuras, quando será possível ajustar as doses dos hormônios e por consequência melhorar o resultado das próximas TE. Outro fator limitante também observado foi a pouca quantidade de receptoras, isso deve ser ajustado a fim de evitar um possível desperdício de embriões.

A biotecnologia reprodutiva aplicada a pecuária brasileira vem sendo difundida de forma acelerada, mas se faz importante destacar que pelo custo financeiro de uma biotecnologia como a TE, uma série de variantes devem ser consideradas antes da implantação, caso contrário pode ocorrer um desperdício de recursos e os resultados não serem satisfatórios; estas variantes foram analisadas criteriosamente na fazenda em que foi realizado o trabalho e ajustes estão sendo realizados no intuito de aprimorar a biotecnologia.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J. et al. **Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle**. Theriogenology, v. 69, p. 72-80, 2008.
- ALVAREZ, R.H. **Dez questões sobre transferência de embriões em bovinos: o papel das receptoras**. Pesquisa e Tecnologia. São Paulo, v. 6, n.2, nov. 2009.
- BALL, P.J.H; PETERS, A.R. **Reprodução em bovinos**. 3 ed. São Paulo: Roca, 2006.
- BEM, A. R.; RUMPF, R.; SOUSA, R. V.; PEIXER, M. A. S. **Manual sobre transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e equina**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995.
- BÓ, G.A; TRÍBULO, A; MAPLETOFT, R.J. **Actualización sobre la superovulación em bovinos**. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 5, 2006. Londrina. Anais... Londrina, 2012 a, p. 178-184.
- BOURNE, G.R. **A review of metabolism and clearance studies with 14C-cloprostenol in the cow**. Acta Veterinaria Scandinavica, v.77, p.5-9, 1981. Supplement.
- BOWEN, JÁ, BAZER FW, BURGHARDT RC. **Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophoctoderm in vivo**. Biol Reprod 55:1098-106.
- BURATINI Jr., J. **Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.31, p.190-196, 2007.
- DEMÉTRIO, D. G. B. **Colheita e transferência de embriões bovinos**. São Paulo, SP.2003. p. 22-23. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu. 2003.
- DREW, S.B., PETERS, A. R. **Effect of buserelin on pregnancy rates in dairycows**. VeterinaryRecord. v.134p. 267-269, 1994.
- FERNANDES, C.A.C. **Inseminação em tempo pré-fixado: o que interfere nos resultados**. Radar técnico Beefpoint, 2005. Disponível em: <http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/reproducao/inseminacao-em-tempo-pre-fixado-o-que-interfere-nos-resultados-24493/> Acesso em: 10/06/2018.
- FERREIRA, A.M. **Reprodução da fêmea bovina: fisiologia aplicada e problemas mais comuns (causas e tratamentos)**. 1ed. Juiz de Fora: Editar, 2010.

FORTUNE, J. E. **The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles.** *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 135-163, 2003.

GAMBARINI, M. L. M. **Curso de transferência de embriões em bovinos.** Goiânia:UFG, 2004.

GONÇALVES, Paulo Bayar Dias; FIGUEIREDO, José Ricardo de; FREITAS, Vicente José de Figueirêdo. **Biotécnicas: Aplicadas à Reprodução Animal.** 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 395.

GOUVEIA, F.F. **A produção in vitro de embriões bovinos.** 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Veterinária. Universidade de Brasília. Brasília. 2011.

GUIDO, M.C. **Transferência de embriões,** São Paulo 2005. Disponível em: [http://eagaspar.com.br/mcguido/transf\\_\\_embriao.htm](http://eagaspar.com.br/mcguido/transf__embriao.htm). Acesso em 05 mai. 2018.

HAFEZ E SE, HAFEZ B.,2004. **Reprodução Animal.** 7.ed. Barueri: Manoele,. pp 513.

HANZEN, P.J., Drost, M., Rivera, R.M., Paula-Lopes, F.F., al-Katanani, Y.M., Krininger, C.E. 3rd & Chase, C.C. Jr. (2000). **Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation.** *Theriogenology*,

MARINHO, L.S.R; UMTURA, R.M; MORETTI, F.; MOINO, L.L; RIGO, A.G; SANCHES, B.V; PONTES, J.H.F; SENEDA, M.M. **Programas de larga escala para receptora de embriões produzidos in vitro.** . In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 26, 2012. Foz do Iguaçu, Anais... Foz do Iguaçu, 2012, p 217-221.

MIZUTA, K. **Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (Bos indicus), Angus (Bos taurus) e Nelore x Angus (Bos indicus x Bos taurus) .** 2003. 98 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

NICASIO, A.C. E GIMENES L.U., **Curso de reprodução animal.** Cursos SENAR ead. Apostila. Goiânia, 2017.

REECE, W. O. **Fisiologia de animais domésticos.** 1ed. São Paulo: Roca, p.281-311, 1996. J. G. et al. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J. Anim. Sci.* (Suppl) v.83, p.63-74, 2004.

RUMPF, Rodolfo et al. **Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e eqüina**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. p. 41-67.

SANTOS, G.M. **Curso de transferência de embriões em bovinos**. CPT Cursos Presenciais. Apostila. 2011.

SCARPELLI, L.C. **Sincronização do ciclo estral em bovinos**. São Paulo: Pharmacia Saúde Animal, 2003.

SEIDEL, G. E. **Critical review of embryo transfer procedures with cattle**. In: MASTROIANNI, L. Jr.; BIGGERS, J. D. (Eds). Fertilization and Embryonic development in vitro. New York: Plenum Press, 1980, p. 323-353.

SENGER, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2. ed. Local: Moscow, Indiana. Current Conceptions, Inc., 2003. p. 284-296.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. IETS, p. 112-113, Illinois, 1998

TECNOPEC. **Manual técnico sobre sincronização e inseminação artificial em tempo fixo em bovinos**. São Paulo. 2010. Disponível em: < [www.tecnopec.com.br](http://www.tecnopec.com.br)> Acesso em 06 jun. 2018.

VALENTIM, R.; GOFERT, L. **Conceitos sobre sincronização de receptoras**. 06, fev, 2004. Disponível em: < <http://www.befpoint.com.br> > Acesso em:02 /04/2018.

VIANA, J.H.M. **Classificação de embriões bovinos produzidos em vivo**. 19, abr, 2012. Disponível em: <http://www.cigeneticabovina.com.br/index.php?ref=18&tipo=4>. Acesso em 06 mai. 2018.

WILLIAMS, G. L. **Implicações de amamentação e manejo de cria na eficiência reprodutiva futura de vacas de corte**. In: v curso novos enfoques na reprodução de bovinos, 2001. Uberlândia. Anais... Uberlândia, 2001. p 65.