

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
MEDICINA VETERINÁRIA

Letícia Vieira Lipert Pazzim

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS: REVISÃO DE LITERATURA

Curitibanos

2021

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS: REVISÃO DE LITERATURA

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

Orientador: Prof. Dr. Vitor Braga Rissi.

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

Pazzim, Leticia
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS: REVISÃO DE
LITERATURA / Leticia Pazzim ; orientador, Vitor Braga
Rissi, 2021.
50 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agrárias, Graduação em Medicina Veterinária, Florianópolis,
2021.

Inclui referências.

1. Medicina Veterinária. 2. Bovinos. 3. Doadoras. 4.
Receptoras. 5. Transferência de embriões. I. Braga Rissi,
Vitor. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS: REVISÃO DE LITERATURA

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Médico Veterinário” e aprovado em sua forma final pela seguinte banca:

Curitiba, 29 de setembro de 2021.

Prof. Malcon Andrei Martinez-Pereira, DSc.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Vitor Braga Rissi, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Médico Veterinário André Lucio Fontana Goetten
Avaliador
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Este trabalho é dedicado à minha família, em especial à minha mãe, Evani, e ao meu pai, Júlio Cezar (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao meu pai (*in memorian*), pessoa de quem herdei o amor pelos animais. Infelizmente não poderemos comemorar esta vitória fisicamente, mas sei que estás orgulhoso. Esta conquista é nossa. Prometo te honrar como pessoa e profissional. Te amo.

Agradeço aos meus avós, Leda e Antônio (*in memorian*), por me permitirem crescer próxima da natureza e dos animais. Vocês foram fundamentais para que eu me tornasse Médica Veterinária.

Agradeço à minha mãe, minha fonte de inspiração, força e amor. Sem você, nada disto seria possível. Obrigada por nunca desistir de mim e por sempre acreditar na minha capacidade. Que tenhamos ainda mais conquistas e vitórias para comemorarmos juntas. Amo você, além do infinito.

Agradeço à minha irmã, Júlia, minha segunda mãe. Serei eternamente grata pelo cuidado e amor durante estes anos. Tu foste fundamental para eu vencer as dificuldades encontradas ao longo deste período.

Agradeço ao meu noivo, Julian. Amor, serei eternamente grata por embarcar comigo nesta aventura e viver do meu sonho. Apesar de todas as barreiras encontradas ao longo deste processo, permaneceu ao meu lado. Espero que tenhamos ainda mais vitórias juntos.

Agradeço às minhas amigas e colegas, Kamila Daniel, Léa Oravec, Maria Helena Aguiar, Sylvia Brollo e Thais Sasso. Vocês tornaram estes cinco anos mais leves e alegres. Obrigada por toda a parceria e ajuda.

Agradeço, em especial, à minha melhor amiga, irmã, Bárbara Marçal. Menina iluminada e de um coração gigante. Obrigada por permanecer ao meu lado durante a graduação, mesmo nos momentos de ansiedade e estresse. Levarei para sempre comigo a frase: “Um dia de cada vez”.

Agradeço aos meus professores, por todos os ensinamentos e experiências vivenciadas ao longo destes anos. Com certeza cada um contribuiu para que me tornasse uma Médica Veterinária apaixonada pela profissão.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Vitor Braga Rissi. Obrigada por aceitar o convite de orientador, mas também pelos conselhos e acalento nos momentos de dificuldade no período de estágio.

Agradeço a todos os colaboradores da fazenda RAR, pela paciência e aprendizado. Em especial ao Médico Veterinário Willian Pessoa, seu João, seu Veli, seu Rubens, Luís, Maicon e Luiz Henrique. Apesar das dificuldades encontradas no início do estágio, pude me tornar mais forte como pessoa e profissional. Obrigada por me acolherem e tornarem os meus dias mais alegres. Sentirei saudades desta época. Agradeço ao meu amor de quatro patas, Aurora. Mesmo que você não entenda, agradeço por ter sido minha companheira nos momentos de estudo, mas também por me proporcionar tanto amor e leveza.

Por fim, agradeço a todos que passaram pelo meu caminho e auxiliaram para me tornar Médica Veterinária. Espero, um dia, retribuir de alguma forma.



“Somos do tamanho dos nossos sonhos”.

(Fernando Pessoa)

RESUMO

A transferência de embriões (TE) é uma biotecnologia mundialmente difundida, com o objetivo principal de produzir um número elevado de descendentes geneticamente superiores por fêmea. A partir da TE é possível reduzir o intervalo entre gerações e aumentar a velocidade de melhoramento genético do rebanho, além de permitir que animais geneticamente superiores e com distúrbios reprodutivos adquiridos se reproduzam, impedindo o descarte precoce dos mesmos. A técnica consiste em obter embriões de uma fêmea doadora e transferi-los para receptoras, com a finalidade de completar o período de gestação. Para tanto, torna-se necessário realizar a seleção e a sincronização do ciclo estral de fêmeas doadoras e receptoras de embriões, e protocolo hormonal de superovulação de doadoras, além de colheita, classificação e transferências dos embriões. O presente trabalho de conclusão de curso em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Catarina apresenta uma revisão bibliográfica referente a transferência de embriões (TE) em bovinos. Ao decorrer desta monografia, são descritos os aspectos fisiológicos reprodutivos de fêmeas bovinas, assim como as principais etapas para a realização da transferência de embriões nesta espécie.

Palavras-chave: Bovinos, doadoras, transferência de embriões, receptoras.

ABSTRACT

Embryo transfer (ET) is a globally widespread biotechnology, with the main objective of producing a high number of genetically superior offspring per female. From TE it is possible to reduce the interval between generations and increase the speed of genetic improvement of the herd, in addition to allowing genetically superior animals and those with acquired reproductive disorders to reproduce, preventing or discarding them early. The technique consists of obtaining embryos from a donor female and transferring them to recipients, with a process of completing the gestation period. Therefore, it is necessary to carry out the selection and synchronization of the estrous cycle of donors and recipients of embryos, and a hormonal donor superovulation protocol, in addition to the collection, classification and transfer of the embryos. The present work of completion of the course in Veterinary Medicine at the Federal University of Santa Catarina presents a literature review regarding embryo transfer (ET) in bovines. During this monograph, the physiological reproductive aspects of bovine animals are added, as well as the main steps for carrying out embryo transfer in this species.

Keywords: Cattle, donors, embryo transfer, recipients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura ovariana	18
Figura 2 - Inter-relações no controle da função reprodutiva de uma fêmea	20
Figura 3 - Esquema da sequência das fases do ciclo estral de fêmeas bovinas	23
Figura 4 - Fases do crescimento folicular	24
Figura 5 - Protocolo de SOB de doadoras com Benzoato de Estradiol (BE) e dispositivo intravaginal de Progesterona	30
Figura 6 - Esquema adotado para a coleta de embriões em sistema fechado	32
Figura 7 - Esquema de configuração do sistema fechado de coleta de embriões	33
Figura 8 - Ilustração do desenvolvimento embrionário normal de bovinos	36
Figura 9 - Classificação de embriões bovinos produzidos <i>in vivo</i> , de acordo com a qualidade morfológica	38
Figura 10 - Esquema de envase de embrião em palheta	39
Figura 11 - Protocolo de sincronização OVSYNCH	43
Figura 12 - Protocolo de sincronização de ovulação com associação de Progestágeno, BE e GnRH	43
Figura 13 - Protocolo de TETF, usando Novormon® (eCG) e inovulação no D17, sem detecção de cio	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais funções dos hormônios envolvidos na reprodução de fêmeas	22
Tabela 2 - Protocolo de SOV baseado no cio natural, com associação de FSH e PGF _{2α}	29
Tabela 3 - Protocolo de SOV com associação de FSH, E ₂ , P ₄ , CIDR e PGF _{2α}	30
Tabela 4 - Protocolo de SOV baseado no cio natural, com associação de FSH, PGF _{2α} e GnRH/LH para a inseminação em tempo fixo	31
Tabela 5 - Estágio de desenvolvimento e descrição de qualidade de embriões bovinos	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE	Benzoato de Estradiol
°C	Graus Celsius
CL	Corpo Lúteo
cm	Centímetros
E ₂	Estrógeno
ECC	Escore de Condição Corporal
FD	Folículo Dominante
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
g	Gramas
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
h	Hora
ICM	Massa Celular Interna
IETS	<i>International Embryo Transfer Society</i>
IM	Intramuscular
L	Litros
LH	Hormônio Luteinizante
ml	Miligramas
ng	Nanogramas
P ₄	Progesterona
PGF _{2α}	Prostaglandina dois alfa
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
SNC	Sistema Nervoso Central
SOV	Superovulação
TE	Transferência de Embriões

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. FISILOGIA REPRODUTIVA EM FÊMEAS	18
3.1 Estrutura ovariana	18
3.2 Endocrinologia reprodutiva	20
3.3 Dinâmica folicular	22
4. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES	26
4.1 Seleção de doadoras	26
4.2 Protocolos de superovulação de doadoras	27
4.3 Coleta de embriões	31
4.4 Avaliação morfológica de embriões	34
4.5 Envase e criopreservação	38
4.6 Seleção e preparo de receptoras	40
5. CONCLUSÃO	45

1. INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) é uma biotecnologia mundialmente difundida, a qual possui o objetivo principal de produzir um número elevado de descendentes geneticamente superiores por fêmea, diferentemente dos resultados obtidos fisiologicamente durante uma vida reprodutiva (PASA, 2008). Além disso, a técnica também permite a evolução no sistema de produção em um curto período de tempo, geração em escalas industriais, otimização de recursos e aumento de lucros diante de uma cadeia produtiva (BARUSSELI *et al.*, 2008).

Estudos desenvolvidos sobre o tema mostram que a TE implica na estimulação da produção de oócitos a partir da aplicação de hormônios para a superovulação de uma fêmea doadora (BARROS *et al.*, 2007). Após acasalamento ou inseminação artificial da mesma, os embriões são então coletados através de lavagem do útero com soluções fisiológicas, prosseguindo-se a transferência das estruturas embrionárias para fêmeas receptoras, que serão encarregadas de manter a gestação até o momento do parto (DA SILVA, 2020B).

Em 1891, Walter Heape, considerado o pai da embriologia moderna, demonstrou, pela primeira vez, o sucesso da técnica de TE a partir de coelhos. Naquela época, foram coletados embriões de uma fêmea Angorá e transferidos para a tuba uterina de uma receptora da raça Belgian Hare, obtendo os produtos desejados ao final da gestação (RODRIGUES; BERTOLINI, 2019). Na espécie bovina, a primeira TE foi realizada ainda na metade do último século por Willet. Em termos comerciais, a TE em bovinos teve início nos Estados Unidos durante a década de 70, sendo realizada ainda por laparotomia mediana sob anestesia geral inalatório. Nesta época, a técnica em questão já era considerada comum e importante na área de bovinocultura, visto que facilitaria a importação de genética para diferentes países (GONÇALVES *et al.*, 2014; SEIDEL; SEIDEL, 2005).

O Brasil é considerado atualmente um dos grandes responsáveis pela implantação de tecnologias na reprodução animal no mundo. Em 1980, obteve-se os primeiros registros de transferência de embriões produzidos *in vivo*, sendo que uma década depois o país já se tornava referência mundial e se consolidava na produção e TE na espécie bovina (DA SILVA, 2020B).

Contudo, após um vasto e consolidado conhecimento sobre a colheita de embriões pelo método *in vivo*, o país passou também a dominar e empregar, em larga escala, a produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE). Assim, após 2005, houve rápida expansão da PIVE, técnica que passou a substituir a múltipla ovulação e TE, tornando-se o método de eleição para a produção de embriões. Ou seja, a obtenção *in vitro* possibilitou a otimização da produção de embriões por doadora, redução de custos e criação de novas possibilidades de aplicação da transferência de embriões na produção animal. Apesar da aplicabilidade da PIVE, a TE convencional ainda é utilizada na produção animal, dependendo dos objetivos a serem atingidos e das suas vantagens, assim, é de responsabilidade do Médico Veterinário analisar os benefícios e malefícios de ambas as técnicas para cada situação e determinar qual delas deve ser empregada (VIANA, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever, por meio de uma revisão de literatura, a técnica de transferência de embriões em bovinos, ilustrando os seus principais aspectos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar a fisiologia reprodutiva de fêmeas bovinas;

- Descrever os métodos de seleção das fêmeas doadoras e receptoras de embriões, assim como a aplicação dos seus respectivos protocolos hormonais;

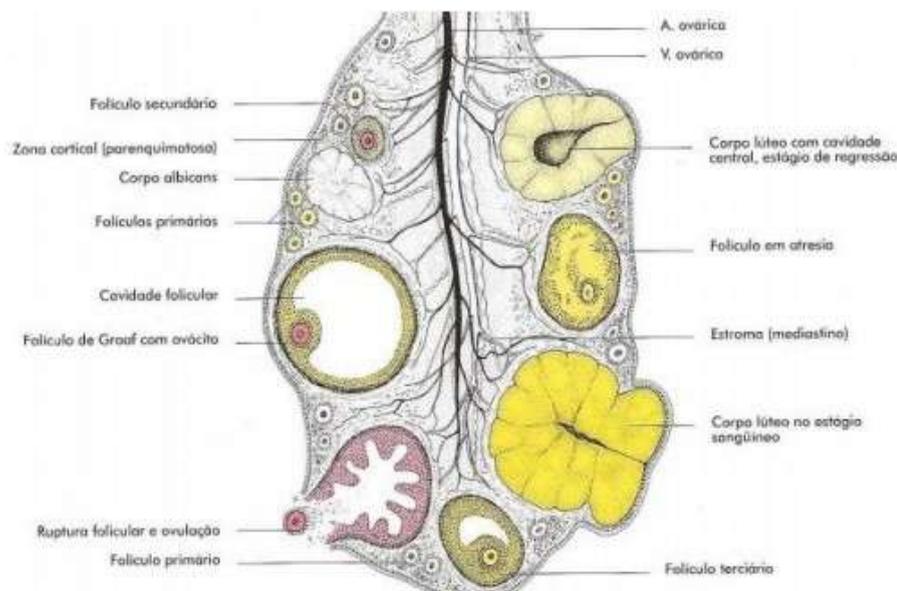
- Analisar o método de coleta, classificação e destino dos embriões.

3. FISILOGIA REPRODUTIVA EM FÊMEAS

3.1 Estrutura ovariana

Os ovários são órgãos pares de natureza endócrina do sistema reprodutor feminino, com localização e tamanho variado nas diferentes espécies, sendo que em fêmeas bovinas possuem, em média, entre 3,0 e 4,5 cm de comprimento e 1,5 a 2,0 cm de largura, com coloração rósea clara. Estes órgãos são constituídos por folículos, estruturas altamente organizadas e responsáveis por proporcionar um ambiente ideal para o crescimento e maturação oocitária, assim como permitir a produção de hormônios importantes para a reprodução (SANTOS *et al.*, 2012). A Figura 1 ilustra uma representação esquemática da anatomia ovariana, contendo estruturas típicas do ovário em uma fêmea cíclica.

Figura 1 - Estrutura ovariana de uma fêmea cíclica.



Fonte: König e Liebich (2004).

A população folicular ovariana é bastante heterogênea, dessa forma, os folículos podem ser classificados de acordo com os seus aspectos morfológicos, em folículos pré-antrais ou não cavitários, que abrangem os folículos primordiais,

primários e secundários; e em folículos antrais ou cavitários, compreendendo os folículos terciários, de Graaf ou pré-ovulatórios (MARTINS *et al.*, 2008). Segundo Mello *et al.* (2013), os folículos pré-antrais não são totalmente dependentes de FSH e LH para o seu desenvolvimento, uma vez que o seu crescimento é estimulado por fatores intra ovarianos e locais. Em contrapartida, os folículos antrais, são totalmente dependentes das gonadotrofinas para o seu desenvolvimento e maturação.

Os folículos primordiais se encontram em estágio de repouso e são compostos por um oócito imaturo, circundado por uma única camada achatada de células somáticas (pré-granulosa). Os folículos primários, por sua vez, são constituídos por um oócito em crescimento envolvido por uma camada de células da granulosa de formato cubóide, porém, não possuem células tecais diferenciadas e podem apresentar uma zona pelúcida em formação. Os folículos secundários são caracterizados por um oócito inteiramente circundado por uma zona pelúcida e apresentam pelo menos duas camadas de células da granulosa com formato cubóide. Já os folículos terciários são constituídos por um oócito envolto pela corona radiata e células do *cumulus*, que conectam o oócito às células da granulosa, mas também possuem as células tecais e uma cavidade contendo líquido folicular. Por fim, os folículos de Graaf ou pré-ovulatórios apresentam todos os componentes presentes nos folículos terciários, contudo, o oócito já estará no estágio final de desenvolvimento (SANTOS *et al.*, 2012).

Sabe-se que o desenvolvimento folicular bovino tem início ainda na vida fetal a partir de células germinativas primordiais. Estas células são provenientes do endoderma do saco embrionário vitelino e são responsáveis pela formação e manutenção do ovário. A partir de sucessivas mitoses e síntese de DNA, estas células atingem a fase de oócitos primários, onde adquirem uma camada única de células da pré-granulosa, formando os folículos primordiais (SANTOS, 2017).

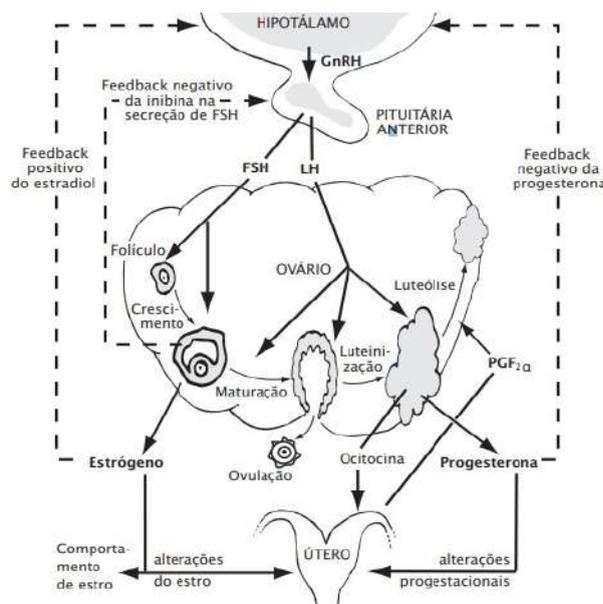
Ao nascimento, os ovários contêm grande quantidade destes folículos primordiais, que apresentam no seu interior oócitos com o núcleo no estágio de prófase I da meiose, permanecendo em repouso até que ocorra um pico de LH, momento em que o folículo já se encontra numa fase pré-ovulatória. Na puberdade, o eixo-hipotálamo-hipofisário influencia o crescimento folicular a partir da ação de gonadotrofinas, assim, há proliferação contínua e diferenciação celular, até a formação de folículos antrais maduros, que já possuem diâmetro necessário para a

ocorrência de ovulação (SANTOS, 2017; FILHO *et al.*, 2013). Os folículos maduros são responsáveis por secretar estradiol, hormônio que provoca o pico pré-ovulatório de LH, resultando na ovulação e no desenvolvimento do corpo lúteo (GONZÁLEZ, 2002).

3.2 Endocrinologia reprodutiva

A fisiologia do ciclo estral é complexa e depende da interação entre o sistema nervoso central, sistema endócrino e órgãos genitais (Figura 2). O sistema nervoso central (SNC) recebe informações externas do ambiente através de estímulos visuais, olfativos, auditivos e táteis, assim, a partir do estímulo do SNC, os neurônios endócrinos induzem a secreção pulsátil de GnRH pelo hipotálamo, hormônio que irá atuar em receptores da hipófise anterior, glândula também encontrada na porção ventral do cérebro (SANTOS *et al.*, 2012).

Figura 2 - Inter-relações no controle da função reprodutiva de uma fêmea.



Fonte: Intervet Internacional (2007).

Ao ocorrer esta interação, dá-se início a síntese e liberação, também pulsátil, dos hormônios de natureza glicoproteica, denominados FSH e LH, pela hipófise. Em

seguida, estas gonadotrofinas são liberadas na corrente sanguínea, chegando até os órgãos-alvo, neste caso, os ovários. O FSH é responsável pelo crescimento e a maturação dos folículos ovarianos, enquanto o LH tem como função induzir a ovulação, além de estimular, junto com o FSH, a secreção de hormônios esteroides (OLIVEIRA A. F. M. *et al.*, 2014).

As células da granulosa, estimuladas pelo FSH, produzem o estradiol, hormônio responsável pelos sinais e manifestação de estro, com mudanças típicas do trato genital da fêmea. É importante salientar que, níveis elevados de estrógeno, inibem a liberação de FSH e estimulam a secreção de LH, realizando um *feedback* negativo e positivo, respectivamente (GONZÁLEZ, 2002).

Após a ovulação, há a formação do corpo lúteo (CL), glândula endócrina temporária presente durante a fase de diestro em fêmeas cíclicas ou durante a gestação. O CL possui função de secretar progesterona, hormônio responsável pela preparação do útero para a manutenção da gestação. Assim, a progesterona não só suprime a resposta imunitária do útero, o que é necessário para tolerar o embrião, mas também evita as contrações uterinas, fecha o colo do útero e modifica as características do muco cervical, tornando-o mais viscoso e impedindo a passagem de agentes estranhos para o seu interior. Ainda, na glândula mamária, este hormônio estimula o desenvolvimento do sistema alveolar, preparando-o para a síntese e a secreção de leite (DA SILVA, 2020A).

Contudo, caso não haja embrião viável no útero da fêmea, ocorre a luteólise no dia 16 do ciclo reprodutivo da vaca, a partir da ação do hormônio $\text{PGF}_{2\alpha}$, produzido pelo útero (GONZÁLEZ, 2002). Sabe-se que, após um período de 12 a 14 dias de exposição à progesterona, as células endometriais e o eixo hipotálamo-hipofisário tornam-se insensíveis a este hormônio. Em consequência, o estradiol, produzido pelo folículo dominante, estimula a produção de receptores para ocitocina no endométrio uterino, mas também induz a liberação do mesmo hormônio pela neurohipófise. Em decorrência da ação da ocitocina sobre seus receptores endometriais, ocorre a síntese e secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, responsável pela luteólise (DA SILVA, 2020A). A Tabela 1 demonstra os principais hormônios que agem no trato reprodutivo feminino, assim como suas estruturas de origem e suas respectivas funções.

Tabela 1 - Principais funções dos hormônios envolvidos na reprodução de fêmeas.

Hormônio	Fonte	Função
GnRH	Hipotálamo	Promove a liberação do FSH e LH
FSH	Hipófise anterior	Estimula o desenvolvimento folicular e a secreção de estrógenos
LH	Hipófise anterior	Estimula a ovulação, formação e manutenção do corpo lúteo
Estradiol	Folículo (ovário)	Estimula a manifestação do cio e a liberação do LH
Progesterona	Corpo lúteo (ovário)	Manutenção da gestação

Fonte: Hafez e Hafez (2004).

3.3 Dinâmica folicular

As fêmeas bovinas são consideradas poliéstricas anuais, ou seja, apresentam vários estros ao longo do ano, com duração de 21 dias, em média. O ciclo estral é dividido em duas fases: a estrogênica ou folicular, que se estende do proestro ao estro, resultando na ovulação; e a progesterônica ou luteínica, que envolve o metaestro e o diestro, encerrando na luteólise (VALLE, 1991).

Sabe-se que o estágio de estro da espécie bovina possui duração de oito a dezoito horas, momento em que a fêmea aceita a cópula ou a monta de outra vaca. Isto ocorre devido ao aumento significativo das concentrações de estradiol produzido pelo folículo pré-ovulatório, mas também por causa da ausência de corpo lúteo. O metaestro é a etapa posterior ao estro, possuindo duração de quatro a cinco dias. Durante esta etapa ocorre a ovulação, seguida do desenvolvimento do corpo de lúteo. Após a ovulação, observa-se uma depressão no lugar ocupado pelo folículo ovulatório (depressão ovulatória) e, posteriormente, desenvolve-se o corpo hemorrágico (corpo lúteo em processo de formação). Durante o metaestro, as concentrações de progesterona começam a aumentar até atingirem níveis superiores a 1 ng/ml, assim, considera-se que o corpo lúteo atingiu a maturidade. No momento em que as concentrações de progesterona são superiores a 1 ng/ml, inicia-se o final do metaestro e o início do diestro (DA SILVA, 2020A).

O diestro é o estágio de maior duração do ciclo estral de uma fêmea, ocorrendo entre doze e quatorze dias. Durante este estágio, o corpo lúteo mantém sua plena funcionalidade, o que se reflete em concentrações sanguíneas de progesterona maiores do que 1 ng/ml. Além disso, nesta fase, pode-se encontrar

23

folículos de

tamanhos diferentes devido às ondas foliculares. Após 12 a 14 dias de exposição à progesterona, o endométrio começa, gradualmente, secretar $\text{PGF}_{2\alpha}$ em um padrão pulsátil, ocorrendo a luteólise. Ou seja, o corpo lúteo perde a sua funcionalidade e, em consequência, as concentrações de progesterona diminuem abaixo de 1 ng/ml, finalizando o diestro e começando o proestro (DA SILVA, 2020A).

O proestro, por sua vez, caracteriza-se pela ausência de um corpo lúteo funcional e pelo desenvolvimento e maturação do folículo ovulatório. Este estágio do ciclo estral da vaca apresenta duração de dois a três dias, sendo caracterizado pelo declínio nos níveis de progesterona, pelo desenvolvimento folicular e pelo aumento dos níveis de estradiol no sangue. Nessa fase, a liberação do GnRH pelo hipotálamo estimula a secreção de FSH e LH pela glândula pituitária. Os elevados níveis de FSH sanguíneo induzem o desenvolvimento dos folículos e, em sinergismo com o LH, estimulam a sua maturação. À medida que os folículos se desenvolvem, aumenta a produção de estradiol, após uma determinada concentração, este hormônio estimula a manifestação do cio e a liberação massiva do LH, dando início ao estro (VALLE, 1991). As etapas do ciclo estral de fêmeas bovinas estão ilustradas no esquema abaixo (Figura 3).

Figura 3 - Esquema da sequência das fases do ciclo estral de fêmeas bovinas.

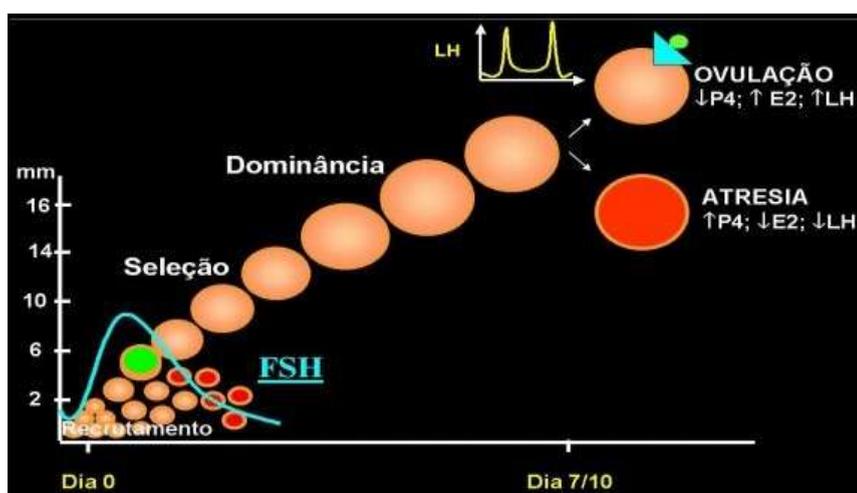


Fonte: Furtado *et al.* (2011).

O desenvolvimento folicular dos bovinos ocorre em um padrão de ondas, sendo que cada onda de crescimento é caracterizada pelas etapas de recrutamento, seleção

e dominância, ovulação ou atresia (Figura 4). Durante o ciclo estral de fêmeas bovinas, são apresentadas de duas a três ondas foliculares, sendo que a ovulação irá ocorrer apenas na última. Em vacas com três ondas foliculares, a fase lútea é mais longa e, conseqüentemente, o ciclo estral também é mais comprido, de 22 a 23 dias. No entanto, as vacas com duas ondas apresentam um ciclo estral de 18 a 21 dias, sendo que o período de dominância folicular é maior nestes animais, o que influencia no potencial dos ovócitos para desenvolver um embrião viável. Ou seja, a porcentagem de concepção é menor quando ovulam folículos que tiveram mais dias de dominância (DA SILVA, 2020A).

Figura 4 - Fases do crescimento folicular.



Fonte: Tecnopec (2002).

Basicamente, uma onda de crescimento folicular consiste no recrutamento de um grupo de pequenos folículos primordiais que passam por um crescimento comum durante cerca de três dias. Destes folículos recrutados, apenas um é selecionado, continuando seu desenvolvimento, enquanto os outros sofrem atresia, estabelecendo-se, então, o fenômeno da divergência folicular (SILVA *et al.*, 2011).

A primeira fase da onda de crescimento folicular corresponde ao recrutamento, onde há o início do crescimento de vários folículos, desencadeado pelo hormônio folículo estimulante (FSH). A segunda fase corresponde à seleção e dominância, onde um folículo cresce mais do que os outros, tornando-se dominante (OLIVEIRA A. F. M. *et al.*, 2014). De acordo com Alves *et al.* (2002), o folículo dominante consegue manter

seu crescimento em função do aumento do número de receptores para gonadotrofinas e aumento do seu aporte sanguíneo. Os hormônios estradiol e inibina, produzidos pelas células da granulosa do folículo dominante, reduzem a liberação de FSH a concentrações muito baixas, insuficientes para manter o desenvolvimento dos folículos subordinados, porém, suficientes para manter o crescimento do folículo dominante, causando então a regressão dos demais. Dessa forma, o folículo dominante (FD) é capaz de inibir o crescimento e induzir a atresia dos outros folículos em desenvolvimento, mas também de bloquear o surgimento de uma nova onda de crescimento folicular. O FD perdura de quatro a seis dias e, caso não ovule, também sofre atresia. Após esta regressão do FD, diminuem-se os níveis de estrogênio e inibina, observando-se um aumento das concentrações de FSH, com início de uma nova onda de crescimento folicular (DA SILVA, 2020A).

A terceira fase da onda de crescimento folicular é a ovulação, que é desencadeada pelo pico de LH liberado pela hipófise. Sabe-se que a ovulação do FD somente ocorre quando há alta concentração de estrógeno e níveis baixos de progesterona. Ou seja, caso um corpo lúteo funcional esteja presente, não haverá liberação de pico de LH e ovulação. Assim, os folículos da onda que não ovularam, entrarão em um processo de degeneração (OLIVEIRA A. F. M. *et al.*, 2014).

Portanto, durante a fase luteínica do ciclo estral, a frequência de pulsos de LH é insuficiente para estimular a diferenciação final e ovulação do FD. Ao entrar em atresia, o FD perde a dominância e ocorre recrutamento de uma nova onda de crescimento folicular. Na fase folicular do ciclo, com a ausência de P₄, há o aumento na frequência de pulsos de LH, que estimula a liberação de quantidades crescentes de E₂ pelo FD. Este, por sua vez, induz mudanças de comportamento associadas ao estro, mas também leva a liberação de um pico pré-ovulatório de GnRH e LH, o que causa a ovulação do FD (BINELLI *et al.*, 2001).

4. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

A transferência de embriões é uma biotecnologia da reprodução que consiste em obter embriões de uma fêmea doadora e transferi-los para fêmeas receptoras, com a finalidade de completar o período de gestação. O principal objetivo da técnica é permitir que uma fêmea produza um número de descendentes muito superior ao que seria possível fisiologicamente, durante sua vida reprodutiva (SANTOS *et al.*, 2012).

A transferência de embriões apresenta um papel importante no melhoramento zootécnico, já que acelera e confere maior precisão no processo de seleção animal. A partir da TE é possível aumentar o número de descendentes de animais geneticamente superiores, reduzir o intervalo entre gerações e aumentar a velocidade de melhoramento genético do rebanho (ANDRADE *et al.*, 2002). Além disso, a técnica permite que animais geneticamente superiores e com distúrbios reprodutivos adquiridos se reproduzam, impedindo o descarte precoce dos mesmos (HONORATO *et al.*, 2013).

Apesar das suas vantagens, a TE, assim como qualquer outra técnica, apresenta algumas limitações. Estas podem estar associadas às fêmeas doadoras de embriões, havendo discrepância nas respostas aos tratamentos hormonais, mas também relacionadas às receptoras. A seleção e o manejo adequado das receptoras de embriões são indispensáveis para o sucesso da TE, uma vez que a mortalidade após a transferência é ainda significativa e limita muito a eficiência desse método (HONORATO *et al.*, 2013).

4.1 Seleção de doadoras

Desde o início da implantação da técnica de TE, a base para a seleção de fêmeas doadoras de embrião é a escolha de animais geneticamente ou fenotipicamente superiores. Contudo, a seleção de doadoras também pode ser realizada a partir do mercado, classificação da indústria ou simplesmente pelo desejo do proprietário em produzir mais descendentes de um determinado animal.

28

Além disso, características como lactação, paridade, dias abertos, fatores endócrinos

e

ambientais também devem ser levados em consideração para a seleção do animal doador de embriões (HOPPER, 2015).

Considerando que o objetivo da técnica de TE nas doadoras de embriões é efetuar a superovulação delas, é necessário que o seu sistema reprodutivo esteja saudável, apresentando ciclos estrais regulares. Dessa forma, durante o exame reprodutivo, é importante descartar animais que apresentam defeitos anatômicos e distúrbios reprodutivos (origem genética ou adquirida), uma vez que tais condições impedem a coleta, o desenvolvimento e transporte adequado dos gametas e embriões, inviabilizando o procedimento de TE (OLIVEIRA C. S. *et al.*, 2014).

Santos (2012) também descreve que é importante realizar o exame ginecológico das possíveis doadoras, a fim de descartar presença de gestação, mas também avaliar a ausência de infecções e o histórico de problemas reprodutivos. Outro critério reprodutivo que deve ser considerado é que a escolha de doadoras para um programa de TE não deve ser feita antes de 60 dias pós-parto, sendo necessário, ainda, observar-se dois ciclos estrais consecutivos e regulares (WILLIAMS, 2001).

Além disso, outro aspecto importante para a seleção é analisar o bem-estar das doadoras, já que, sob situações de estresse, não respondem de maneira eficiente ao tratamento superovulatório (WILLIAMS, 2001). Também é necessário avaliar o estado corporal dos animais, onde as doadoras devem estar sadias e com bom escore corporal (ECC 3, considerando uma escala de 1-5) (SANTOS, 2012).

4.2 Protocolos de superovulação de doadoras

Sabe-se que os protocolos superestimulatórios utilizados na TE apresentam o objetivo de conseguir um número máximo de oócitos competentes e embriões transferíveis, obtendo-se, conseqüentemente, uma alta probabilidade de gestação das fêmeas receptoras (SANTOS, 2017). Nesta técnica, as doadoras podem ser superovuladas em um intervalo de 60 dias entre duas coletadas, sendo que o procedimento pode ser realizado durante um período de 1 a 2 anos, possuindo resultados satisfatórios (ALVAREZ *et al.*, 2007).

A fêmea bovina é uma espécie monovulatória, portanto, apenas um oócito deve ser liberado de um folículo durante seu ciclo estral. O princípio da técnica de superovulação envolve o conceito de induzir a ovulação de vários folículos e consequente liberação de vários oócitos, permitindo a fertilização e o desenvolvimento destas estruturas até o estágio de blastocisto (OLIVEIRA C. S. *et al.*, 2014).

Para tanto, a onda folicular pode ser estimulada com FSH, sendo que altas doses deste hormônio são administradas aos animais antes que se estabeleça a dominância folicular. Dessa maneira, os efeitos inibitórios do folículo dominante sobre o crescimento dos demais folículos são bloqueados. Ou seja, o hormônio folículo estimulante em altas concentrações promove o crescimento simultâneo de vários folículos com características fisiológicas semelhantes daqueles selecionados para ovularem. A divergência folicular é impedida, e os folículos terciários, que seriam fadados a atresia, tornam-se folículos ovulatórios (OLIVEIRA C. S. *et al.*, 2014).

Segundo Santos (2017), na década de 70, utilizava-se a gonadotrofina coriônica equina (eCG) com a finalidade de superovulação, sozinha ou em combinação com anti-soro da molécula de eCG. Posteriormente, surgiu o FSH extraído da pituitária de suínos, equinos e ovinos, além do FSH recombinante bovino. Tanto o FSH quanto o eCG podem ser utilizados para se obter uma superovulação. No entanto, o FSH, por ter uma meia vida mais curta do que o eCG, precisa ter a sua dose total dividida e em intervalos de 12 horas ao longo de 3 a 4 dias, para estimular a mesma quantidade de crescimento folicular que resultaria de uma injeção de eCG (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A dosagem de FSH varia conforme o produto (laboratório), a categoria, estado fisiológico, escore corporal, a raça e a individualidade da doadora, sendo que para raças zebuínas utiliza-se uma dose menor e para as raças europeias uma dose maior. As vantagens da utilização do FSH em SOV são meia vida curta (12h); baixo risco de reações anafiláticas; melhores resultados em estruturas viáveis por coleta; e facilidade de aquisição. No entanto, as desvantagens são a necessidade de aplicação a cada 12 horas durante o protocolo, além do elevado custo (PASA, 2008).

Existem diferentes protocolos de SOV em fêmeas doadoras de embrião, podendo ser utilizados em cio natural ou em qualquer fase do ciclo estral. Em

31

qualquer protocolo de superovulação, realizam-se oito aplicações decrescentes de FSH via IM

com intervalos de 12 horas. A aplicação de doses decrescentes tem por objetivo mimetizar a queda fisiológica do FSH durante a fase folicular, melhorando a resposta superovulatória. No terceiro dia de SOV, faz-se duas aplicações de $\text{PGF}_{2\alpha}$ promovendo a luteólise, a fim de reduzir as concentrações de P_4 e permitir a ocorrência pico de LH e ovulação (PENITENTE FILHO *et al.*, 2014). Contudo, no protocolo tradicional de superovulação, o tratamento com gonadotrofinas é iniciado na metade do ciclo estral (8-12 dias após ovulação), sendo necessário também detecção do estro antes de iniciar o tratamento hormonal (BARUSSELI *et al.*, 2008). A Tabela 2 ilustra este protocolo de SOV baseado em cio natural.

Tabela 2 - Protocolo de SOV baseado no cio natural, com associação de FSH e $\text{PGF}_{2\alpha}$.

DIA	0	10	11	12	13	14	15
MANHÃ	CIO	FSH	FSH	FSH e $\text{PGF}_{2\alpha}$	FSH	CIO	IA
TARDE		FSH	FSH	FSH e $\text{PGF}_{2\alpha}$	FSH	IA	

Fonte: Penitente Filho *et al.* (2014).

Sabe-se que a ausência do folículo dominante e a realização da superovulação no início da onda de crescimento folicular aumentam a eficiência dos programas de SOV. Dessa forma, protocolos hormonais são uma alternativa para o controle da emergência da onda de crescimento folicular em momentos aleatórios do ciclo estral, sem a necessidade de detecção do estro. Um exemplo de protocolo é a associação de estradiol (E_2) e progesterona (P_4), onde há indução da emergência da nova onda de crescimento folicular (BARUSSELI *et al.*, 2008).

A associação de P_4 e E_2 na SOV permitiu um grande avanço para a biotecnologia da reprodução animal (Tabela 3), já que possibilita que o processo seja iniciado em fases aleatórias do ciclo estral dos bovinos pelo fato de sincronizar o início da onda folicular, além de descartar a necessidade de observação de estro. Contudo, ainda requer a detecção do estro para a inseminação artificial das doadoras. O E_2 , quando combinado com aplicação intramuscular de P_4 e implante intravaginal de P_4 , possui a função de suprimir o desenvolvimento folicular, permitindo o início de uma nova onda de crescimento folicular (PENITENTE FILHO

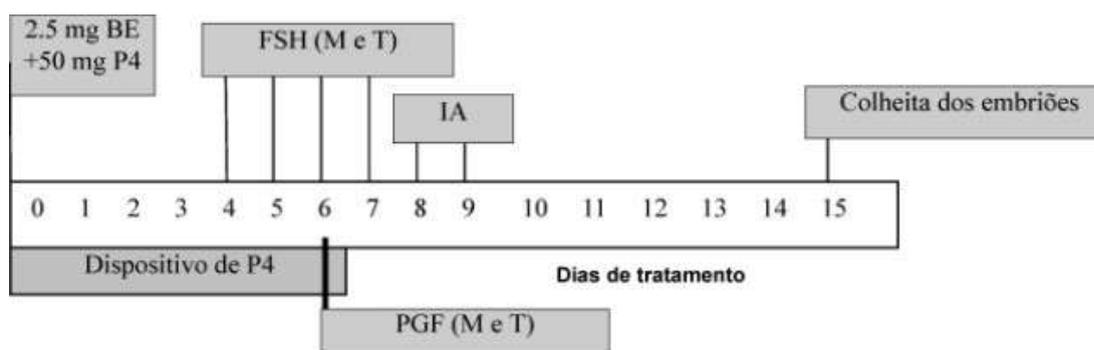
Tabela 3 - Protocolo de SOV com associação de FSH, E₂, P₄, CIDR e PGF_{2α}.

DIA	0	4	5	6	7	8	9
MANHÃ	P ₄ + E ₂ + CIDR	FSH	FSH	FSH	FSH – CIDR	CIO	IA
TARDE		FSH	FSH	FSH e PGF _{2α}	FSH	IA	

Fonte: Penitente Filho *et al.* (2014).

Bó *et al.* (2004) descrevem o protocolo para superovulação de doadoras com Benzoato de Estradiol (BE) e dispositivo contendo Progesterona, além de aplicação de P₄ IM no dia 0. O tratamento superovulatório com gonadotrofina tem início no dia 4, sendo realizadas duas aplicações diárias de FSH durante 4 dias. Na manhã e na tarde do dia 6 são feitas duas aplicações de PGF_{2α} e remoção do dispositivo contendo progesterona. Posteriormente, os animais são inseminados artificialmente 12 e 24 h após a detecção do cio ou 48 e 60 h após a remoção do dispositivo contendo progesterona. Por fim, os embriões são colhidos no dia 15. Este esquema de SOV é ilustrado na Figura 5.

Figura 5 - Protocolo de SOV de doadoras com Benzoato de Estradiol (BE) e dispositivo intravaginal de Progesterona.



Fonte: Bó *et al.* (2004)

Contudo, nem sempre a ovulação está sincronizada nos tratamentos de SOV, assim, há dificuldade no acerto das inseminações realizadas, ocasionando a recuperação de inúmeras estruturas não fecundadas. Folículos que não ovulam, após superestimulação com FSH, não se desenvolvem normalmente ou não possuem quantidade suficiente de receptores de LH, para responderem ao pico pré-ovulatório deste hormônio. Portanto, estratégias que atrasam o pico

35

pré-ovulatório de LH têm

sido utilizadas na tentativa de aumentar o número de embriões ou, ainda, para viabilizar a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) após a superovulação (BARROS *et al.*, 2007). Dessa forma, o GnRH ou LH vêm sendo utilizados para controle da ovulação no final destes protocolos (PENITENTE FILHO *et al.*, 2014), conforme é demonstrado na Tabela 4, logo abaixo.

Tabela 4 - Protocolo de SOV baseado no cio natural, com associação de FSH, PGF_{2α} e GnRH/LH para a inseminação em tempo fixo.

DIA	0	10	11	12	13	14	15
MANHÃ	CIO	FSH	FSH	FSH e PGF _{2α}	FSH	GnRH / LH	IA
TARDE		FSH	FSH	FSH e PGF _{2α}	FSH	IA	

Fonte: Penitente Filho *et al.* (2014).

4.3 Coleta de embriões

A coleta de embriões deve ser realizada, preferencialmente, entre o sexto e o oitavo dia após a primeira inseminação das doadoras, já que, neste período, as estruturas encontram-se flutuando em um filme líquido no lúmen da ponta dos cornos uterinos (HONORATO *et al.*, 2013). Além do mais, trata-se de um período mais indicado para a obtenção de embriões nos estádios de mórula ou blastocistos destinados à transferência imediata, bipartição ou criopreservação (GONÇALVES *et al.*, 2014).

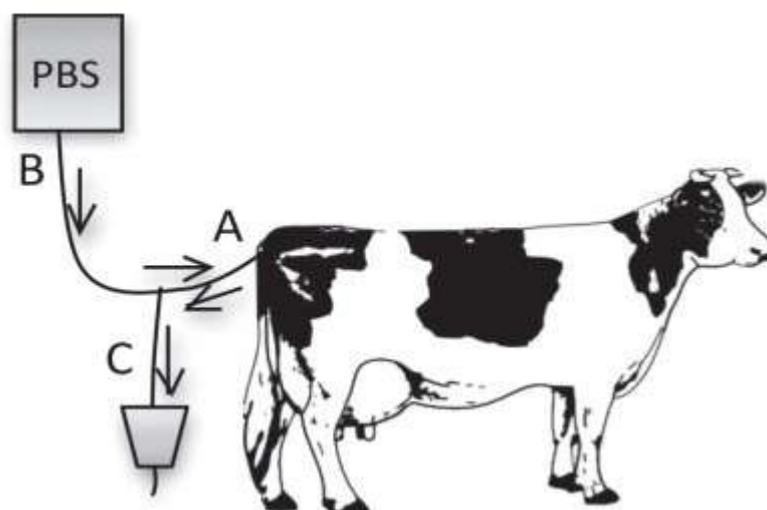
Segundo Pasa (2008), há dois métodos para a colheita de embriões: o método aberto e o fechado. No método aberto de colheita, utiliza-se uma seringa de plástico acoplada diretamente ao cateter posicionado no corno uterino, onde deve ser realizada a lavagem uterina com frações de 40 a 50 ml de meio de coleta. Quando obtidas, essas frações são depositadas em um recipiente siliconizado, geralmente um cilindro de vidro graduado com capacidade para 500 ml. Considerando o grande número de lavagens por corno uterino com o objetivo de uma maior taxa de recuperação de embriões, este método de colheita se torna inviável em questão de tempo e exposição dos embriões às condições de ambiente, o que pode repercutir negativamente na viabilidade dos mesmos. Através do método

37

fechado (Figura 6),

buscou-se tornar a colheita por via transcervical uma técnica prática, asséptica e segura para a doadora, com a menor possibilidade de contaminação ou de perda dos embriões. Além disso, o circuito fechado propicia uma maior pressão no interior do corno uterino, o que favorece a recuperação do meio de lavagem infundido para o interior do útero. Neste método de coleta, a sonda utilizada pode ser fixada no corpo do útero, lavando os dois cornos uterinos de uma só vez, ou na base de cada corno uterino, onde a lavagem é realizada em um corno por vez (OLIVEIRA C. S. *et al.*, 2014).

Figura 6 - Esquema adotado para coleta de embriões em sistema fechado.



Legenda: O equipo em Y liga-se à sonda de Foley na extremidade A, ao frasco de PBS, na extremidade B, e ao filtro coletor, na extremidade C. Através de válvulas, o veterinário controla a direção do fluxo: primeiramente de B para A, posteriormente de A para C.

Fonte: Oliveira C. S. *et al.* (2014).

Inicialmente, faz-se palpação transretal com auxílio do aparelho de ultrassonografia para detectar a presença ou não de corpos lúteos no ovário. Em caso de resposta positiva, a fim de facilitar a introdução do cateter dentro do útero, pode-se sedar o animal com Acepromazina 1% e realizar a anestesia epidural caudal baixa com 5 a 7 ml de Lidocaína a 2% (GONÇALVES *et al.*, 2014).

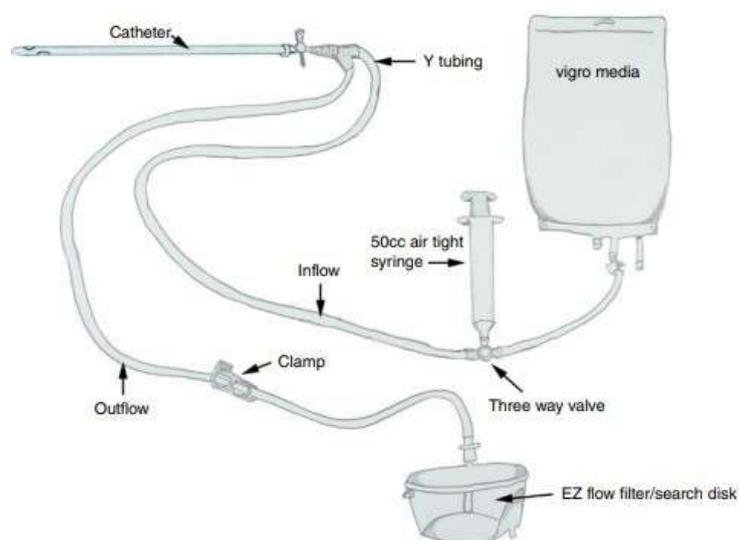
Em seguida, com o auxílio de um cateter de borracha ou de plástico flexível contendo um balão inflável na sua extremidade distal, inicia-se o método de coleta (HONORATO *et al.*, 2013). De acordo com Demétrio (2003), inicialmente, é

introduzido no interior deste cateter um mandril de metal, para torná-lo rígido. Em seguida, com auxílio de palpação retal, ambos são colocados e posicionados em um dos cornos uterinos. Posteriormente, o balão presente na extremidade do cateter, já dentro de um dos cornos uterinos, é inflado com 10 a 20 ml de ar, logo após o mandril é retirado do interior do cateter.

Após a retirada do mandril, uma sonda em Y é acoplado à sonda de Foley/cateter, compondo o sistema fechado de coleta de embriões. Em suas outras extremidades, são fixados o frasco de meio de coleta, e o copo coletor de embriões. O sistema contém uma trava em cada extremidade, para controle da entrada e saída do líquido instilado, formando uma pressão negativa que facilita a retirada do conteúdo (OLIVEIRA C. S. *et al.*, 2014).

O copo coletor apresenta um filtro que permite a retenção apenas dos embriões, desprezando o restante do conteúdo recuperado. Instila-se o conteúdo até encher os cornos, fecha-se a trava da saída do DPBS, e a saída para o copo coletor é aberta, recolhendo o líquido instilado. A operação é repetida várias vezes, até lavar o útero com cerca de 1 L de meio. Quando o balão é desinflado, é retirada a sonda do animal (OLIVEIRA C. S. *et al.*, 2014). Os equipamentos utilizados para a coleta de embriões pelo sistema fechado estão ilustrados na Figura 7.

Figura 7 - Esquema de configuração do sistema fechado de coleta de embriões.



Fonte: Hopper (2015).

A solução que hoje é utilizada como meio de colheita de embriões é DPBS (*Dulbecco Phosphate Buffered Saline*), uma solução salina tamponada, com osmolaridade e pH fisiológico, que tem o objetivo de manter as características do embrião (PHILLIPS; JAHNKE, 2016). O DPBS, previamente aquecido entre 25 e 30°C (PENITENTE FILHO *et al.*, 2014), é suplementado com 250.000 UI de Penicilina e 0,10 g Estreptomicina, além de 10% de soro fetal bovino, o qual é previamente inativado 56°C durante 30 minutos (GONÇALVES *et al.*, 2014).

Por fim, de acordo com Hopper (2015), após realizar a lavagem uterina na fêmea doadora de embriões, deve-se aplicar Prostaglandina, a fim de causar a luteólise e impedir o desenvolvimento de uma possível gestação, caso tenha restado algum embrião remanescente no interior do trato reprodutivo dela.

4.4 Avaliação morfológica de embriões

Logo após a coleta, os embriões são transportados do filtro do copo coletor para placas de Petri com diâmetro de 12cm. Inicialmente, a fim de retirar sujidades, este filtro é lavado com DPBS com auxílio de uma seringa agulhada. Posteriormente, através de um estereomicroscópio se faz a primeira busca por embriões, realizando-se movimentos circulares suaves. A partir disto, qualquer estrutura encontrada é retirada com a ajuda de uma seringa e ponteira estéril para uma placa menor (60x35cm), contendo gotas do meio de manutenção. Os embriões devem ser lavados em todas as gotas do meio para diminuir a possibilidade de contaminação, de acordo com as recomendações da *International Embryo Transfer Society* – IETS (2010). Em seguida, inicia-se a classificação embrionária (DEMÉTRIO, 2003; OLIVEIRA C. S. *et al.*, 2014).

Sabe-se que há diversos procedimentos para estimar a viabilidade dos embriões coletados. Atualmente, utiliza-se principalmente a avaliação morfológica. Neste método, a partir de microscopia óptica, é observada a qualidade dos embriões, sendo que existe uma boa correlação entre a qualidade morfológica dos embriões e a posterior taxa de prenhez (ALVAREZ *et al.*, 2007). Segundo Phillips e Jahnke (2016), a avaliação morfológica dos embriões é importante para diferenciar oócitos não

fertilizados de embriões, determinar a qualidade do embrião, identificar anormalidades e determinar se o estágio de desenvolvimento é consistente com a idade do embrião.

Durante a avaliação morfológica de um embrião, consideram-se os seguintes critérios: forma esferóide; simetria dos blastômeros; aparência clara e nítida dos blastômeros; tonalidade escura e uniforme; uniformidade da membrana celular; proporcionalidade entre o embrião e o espaço perivitelíneo; integridade da zona pelúcia; ausência de vacúolo no embrião e fragmentos celulares no espaço perivitelíneo; ausência de fragmentos celulares aderidos à zona pelúcida; e compactação dos blastômeros entre si (GOODHAND *et al.*, 1999).

Os embriões recuperados nos dias 6 a 8 após o início do estro devem ser classificados em grupos com base em seu estágio de desenvolvimento e grau de qualidade usando o sistema de classificação IETS, conforme ilustrado na Tabela 5.

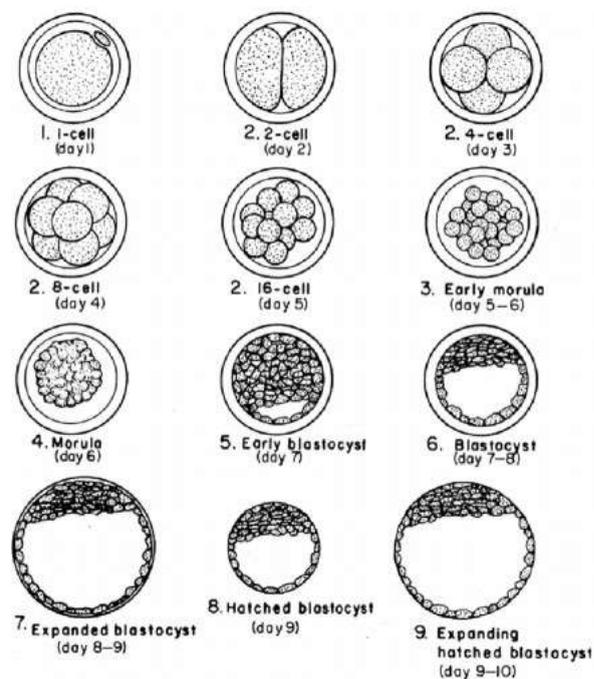
Tabela 5 - Estágio de desenvolvimento e descrição de qualidade de embriões bovinos.

Código	Estágio de desenvolvimento	Código	Qualidade dos embriões
1	Não fertilizado	1	Excelente ou Bom
2	02-12 células	2	Regular
3	Mórula inicial	3	Pobre
4	Mórula	4	Morto ou degenerado
5	Blastocisto inicial		
6	Blastocisto		
7	Blastocisto expandido		
8	Blastocisto eclodido		
9	Blastocisto eclodido expandido		

Fonte: International Embryo Transfer Society (2010).

De acordo com Phillips e Jahnke (2016), são utilizados os seguintes estágios de desenvolvimento para a classificação de embriões (Figura 8):

Figura 8 - Ilustração do desenvolvimento embrionário normal de bovinos.



Fonte: (PHILLIPS; JAHNKE, 2016).

- **Uma célula ou não fertilizado (Estágio 1):** um óvulo coletado por volta do dia 7 é chamado de óvulo não fertilizado. O seu citoplasma parece granular, contendo uma quantidade razoável de espaço perivitelino. O óvulo não fertilizado pode estar degenerando no dia 7 e mostrar uma aparência mais fragmentada.
- **Duas células a doze células (Estágio 2):** embriões que são recuperados por volta do dia 7, contendo 2 a 12 células, são considerados atrasados em seu estágio de desenvolvimento e devem ser considerados mortos ou degenerados.
- **Mórula inicial (Estágio 3):** os embriões neste estágio são divididos em 16 ou mais células e blastômeros individuais. São difíceis de distinguir entre si.
- **Mórula (Estágio 4):** os blastômeros individuais formam uma massa celular compacta, contudo, as células ainda não se diferenciaram.
- **Blastocisto inicial (Estágio 5):** uma cavidade cheia de líquido chamada blastocela começa a se formar dentro da massa celular. A cavidade de

blastocite permite que os blastômeros se diferenciem nas células trofoblásticas externas e massa celular interna (ICM).

- **Blastocisto (Estágio 6):** é um estágio de desenvolvimento em que o embrião tem uma camada de células do trofoblasto na superfície externa, cavidade da blastocite e ICM. Nesta fase, o embrião ocupa a maior parte do espaço perivitelino, e a zona pelúcida ainda possui a mesma espessura.
- **Blastocisto expandido (Estágio 7):** a característica mais marcante desta fase é um aumento no diâmetro geral do embrião, além do adelgaçamento da zona pelúcida.
- **Blastocisto eclodido (Estágio 8):** nesta fase de desenvolvimento embrionário, o embrião está começando a eclodir através de uma fenda na zona pelúcida.
- **Blastocisto expandido eclodido (Estágio 9):** os embriões neste estágio são eclodidos da zona pelúcida e reexpandidos.

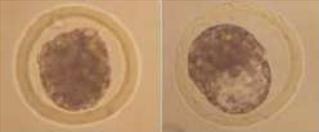
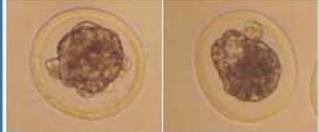
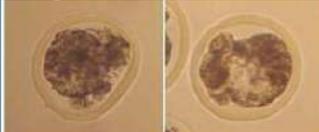
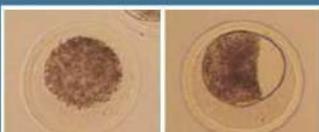
Em contrapartida, Bó e Mapletoft (2013), descrevem da seguinte maneira a classificação quanto a qualidade morfológica do embrião, sendo a mesma demonstrada na Figura 9:

1. **Excelente ou bom:** embriões que possuem simetria esférica, blastômeros uniformes, coloração homogênea, 85% do material celular deve estar intacto e zona pelúcida não deve apresentar concavidades. Os embriões de grau 1 podem ser congelados e comercializados.
2. **Regular:** embriões com irregularidades moderadas de massa (50% da massa do embrião deve estar intacta), tamanho, cor e densidade. 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. Neste caso, 25% do embrião deve estar intacto. Estes embriões não resistem ao processo de congelamento e as taxas de

preñez são ainda menores com esta qualidade mesmo que transferidos a fresco.

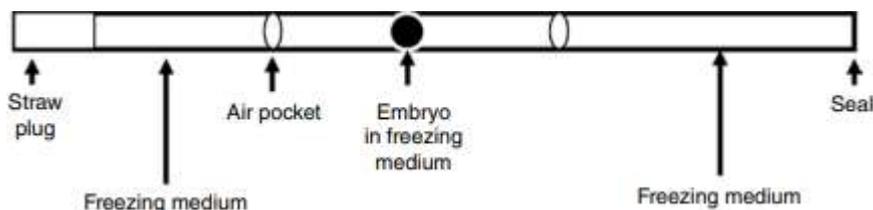
4. **Morto ou degenerado:** oócitos não são viáveis, que devem ser descartados.

Figura 9 - Classificação de embriões bovinos produzidos *in vivo*, de acordo com a qualidade morfológica.

		
<p>Embriões de qualidade excelente Código IETS: 1</p>	<p>Embriões de qualidade boa Código IETS: 1</p>	<p>Embriões de qualidade regular Código IETS: 2</p>
<p>Comentários: Embriões sem defeitos morfológicos ou extrusões celulares, e estágio de desenvolvimento compatível com período pós-ovulação. Máximo potencial de desenvolvimento a fresco ou criopreservado.</p>	<p>Comentários: Embriões com uma ou poucas células de extrusão ou discretas alterações de coloração. Potencial de desenvolvimento semelhante ao embrião grau I, podendo também ser criopreservado.</p>	<p>Comentários: Embriões com maior número de alterações morfológicas ou extrusões celulares, mas com pelo menos 50% da massa celular íntegra e mostrando sinais de desenvolvimento.</p>
		
<p>Embriões de qualidade pobre Código IETS: 3</p>	<p>Embriões degenerados Código IETS: 4</p>	<p>Oócitos não fecundados</p>
<p>Comentários: Extrusões ou fragmentação comprometendo mais que 50% da massa celular, e dificultando a classificação das células viáveis. Potencial de desenvolvimento significativamente reduzido.</p>	<p>Comentários: Embriões com comprometimento definitivo da massa celular, com blastômeros de tamanhos variados apresentando sinais de degeneração celular, pincose, fragmentação e alterações de cor.</p>	<p>Comentários: Oócito sem sinais de clivagem, apresentando graus variados de retração, pulverização ou sedimentação do citoplasma. No menor aumento podem ser confundidos com mórula compacta ou Bi.</p>

se do mesmo em
o *et al.* (2014), o
estando inserido
mento, quando o
objetivo e criopreservar o mesmo. A estrutura e separada por duas colunas de ar e,
ainda, as extremidades da palheta devem conter um lacre e um êmbolo, conforme a
ilustração da Figura 10. Além disso, a palheta deve conter informações mínimas
sobre o pai e mãe do embrião, além da data em que o embrião foi congelado.
Informações adicionais também podem ser incluídas tais como a empresa que
realizou o congelamento, raça de pai, números de registro e o estágio de
desenvolvimento e grau de qualidade do embrião no momento do congelamento
(HOPPER, 2015).

Figura 10 - Esquema de envase de embrião em palheta.



Fonte: Hopper (2015).

Uma alternativa para preservar os embriões a longo prazo é método de criopreservação em botijões de nitrogênio líquido. A criopreservação de embriões, em conjunto com a transferência de embriões, permite uma utilização eficiente de receptoras, reduz a necessidade de mover o gado, permite um meio eficiente de comercialização da genética e, ainda, facilita o movimento internacional da genética bovina (HOPPER, 2015).

Nesta técnica, basicamente, utiliza-se o congelamento e adição de crioprotetores aos embriões, tendo como objetivo preservar o metabolismo celular em estado de quiescência para que este possa ser restabelecido após um período de estocagem, continuando seu desenvolvimento normal. Isso é obtido por meio do armazenamento em baixas temperaturas, que induz à parada da atividade enzimática, do metabolismo e da respiração celular, possibilitando a conservação de células por tempo indeterminado (DALCIN; LUCCI, 2010).

Sabe-se que a maioria dos embriões mamíferos é congelada pelos métodos convencionais, utilizando-se baixas concentrações de crioprotetores, com lenta permeabilidade e refrigeração controlada por equipamento de congelação programável. No entanto, existe outro método, chamado de vitrificação, que dispensa a utilização de equipamentos programáveis, proporciona rapidez e menor tempo de exposição ao crioprotetor, além de prevenir a formação de cristais de gelo pelo uso de elevadas concentrações do crioprotetor (DALCIN; LUCCI, 2010).

A vitrificação compreende o uso de altas concentrações de crioprotetores e uma queda muito rápida da temperatura para -196°C , onde o efeito é congelar estruturas na ausência de formação de cristais de gelo, preservando, assim, a arquitetura intracelular e as membranas. Os crioprotetores mais utilizados neste

processo são DMSO, Polietilenoglicol e até, mesmo, Glicerol. Há também o congelamento lento, um segundo procedimento amplamente utilizado hoje. Neste método, objetiva-se substituir lentamente a água intracelular por crioprotetor (Glicerol ou Etilenoglicol), com ajuda adicional de açúcares (sacarose ou arabinogalactan), para fornecer pressão osmótica extracelular, garantindo a formação mínima de cristais de gelo durante o processo de congelamento (PHILLIPS; JAHNKE, 2016).

Atualmente, os principais crioprotetores utilizados são o Glicerol e o Etilenoglicol. O Glicerol requer uma desidratação e reidratação gradual do embrião, assim, necessita de um equipamento adicional para o processo de descongelamento. Enquanto isso, o Etilenoglicol permite o descongelamento rápido do embrião em água a 25°C. Este processo é chamado de transferência direta, sendo o método mais comum usado hoje na indústria bovina de TE (PHILLIPS; JAHNKE, 2016).

Independentemente do método de criopreservação utilizado, a seleção dos embriões que devem ser criopreservados é sempre um fator importante no sucesso do procedimento. O estágio de desenvolvimento embrionário pode ser um fator que influencia ou afeta a eficiência da criopreservação. Oócitos e embriões em estágio inicial sobrevivem ao ciclo de congelamento e descongelamento da criopreservação com menos eficiência, quando comparados aos estágios posteriores. O blastocisto, normalmente recuperado 7 dias após a apresentação de estro da fêmea, é o estágio utilizado para transferência não cirúrgica de embriões bovinos, sobrevivendo à criopreservação com alto grau de sucesso (HOPPER, 2015).

4.6 Seleção e preparo de receptoras

Sabe-se que a fase de seleção das receptoras de embriões é considerada fundamental em um programa de TE, uma vez que, além de manterem a gestação até o final, também são responsáveis, em determinadas situações, pela alimentação do bezerro, desde o nascimento até o seu desmame (DANTAS *et al.*, 2018). Segundo Seidel e Seidel (2005), fêmeas receptoras necessitam de um programa sanitário rigoroso, nutrição equilibrada e manejo adequado. Os mesmos autores relatam que a falta de receptoras no momento da transferência pode acarretar em

47
custos

econômicos elevados com a criopreservação ou descarte de embriões que não foram utilizados.

De acordo com Gonçalves *et al.* (2014), novilhas e fêmeas primíparas e pluríparas que apresentam ciclo estral regular, que tenham parido, no mínimo, há 60 dias, que o puerpério decorreu normalmente e que estejam livres de doenças ou anomalias do trato reprodutivo, podem ser selecionadas como receptoras de embriões. Contudo, normalmente a utilização de novilhas como receptoras permite obter melhores taxas de prenhez.

Durante a avaliação da fêmea receptora, é importante que seja feito o exame clínico geral, avaliando, principalmente, sistema locomotor, digestório e respiratório. Posteriormente, deve-se realizar o exame específico do aparelho reprodutor, momento em que deve ser avaliada a conformação de vulva, mas também analisar útero e ovários, através de palpação retal e ultrassonografia (YOUNGS, 2007). Segundo Filho *et al.* (2013), é importante a presença de um corpo lúteo funcional no momento da inovulação, já que há aumento na concentração plasmática de P₄, permitindo um ambiente propício para a manutenção da gestação. Contudo, esta é a última seleção, usualmente realizada no dia da transferência.

Além disso, de acordo com Youngs (2007), os animais devem ser negativos para tuberculose, brucelose e leucose enzoótica, além de serem imunizados contra diarreia viral bovina, rinotraqueíte infecciosa bovina, leptospirose, clostridioses, febre aftosa e raiva. Ainda, devem receber vermífugos e ectoparasiticidas, a fim de haver o controle de endoparasitos e ectoparasitos.

Deve-se selecionar as receptoras também a partir do seu estado nutricional. Contudo, não se pode avaliar apenas o escore de condição corporal (ideal é entre 2 e 3, em uma escala até 5), mas também a oferta alimentar adequada. Ou seja, deficiências vitamínicas e/ou minerais, efeitos deletérios de compostos nitrogenados, altos níveis energéticos, balanço energético negativo e queda de escore de condição corporal (ECC) são alguns dos aspectos negativos relacionados à eficiência da reprodução de bovinos (FILHO *et al.*, 2013). É importante salientar que a receptora deve apresentar um porte compatível com a raça do embrião a ser transferido, a fim de garantir uma gestação normal e um parto eutócico, bem como ser capaz de produzir leite suficiente (GONÇALVES *et al.*, 2014).

Para realizar a transferência de embriões é essencial que haja sincronia do ciclo estral de doadoras e receptoras, para que o embrião da doadora e o trato reprodutivo da receptora estejam no mesmo estágio fisiológico de desenvolvimento, o que garante bons resultados nas taxas de prenhez. Contudo, as taxas começam a cair quando a assincronia do estro entre doadoras e receptoras é superior a 24 horas (SPELL *et al.*, 2001).

De acordo com Filho *et al.* (2013), pode-se descartar a utilização de protocolo hormonal para a sincronizar o ciclo estral de receptoras, sendo que é possível realizar este processo apenas a partir do acompanhamento do estro natural. Este manejo apresenta como vantagem o menor custo, uma vez que não se utiliza protocolos hormonais, porém, a observação correta da manifestação do estro e o maior número de animais disponíveis podem se tornar uma desvantagem. Em contrapartida, a opção pela sincronização de estro através de protocolos hormonais possibilita um maior aproveitamento das receptoras, desconsiderando a necessidade de detecção de estro e diminuindo o custo fixo, quando resulta em taxa de prenhez entre 45 e 50% (FILHO *et al.*, 2013).

Uma das opções de protocolo hormonal para a sincronização de receptoras consiste na administração de duas doses de PGF_{2α} com intervalos de 11 a 14 dias. Após a última aplicação deste hormônio, em torno de 5 dias haverá apresentação de sinais de estro (BÓ *et al.*, 2004). No entanto, o uso da PGF_{2α} possui alguns fatores limitantes como mão-de-obra capacitada para detectar o cio; variação no tempo da administração da PGF_{2α} à ocorrência do estro; presença do CL para responder ao tratamento; e limitada quantidade de receptoras detectadas em cio (CHAVES; ALVES, 2014). Segundo Penitente Filho *et al.* (2014), este método é facilmente aplicado a um programa de TE, visto que permite que a primeira dose de PGF_{2α} seja administrada na receptora no momento em que a doadora estiver em cio, antes da superovulação (SOV), enquanto que a segunda dose é realizada após 11-12 dias, ou 12 horas antes da aplicação de PGF_{2α} na doadora.

Uma alternativa de protocolo é o OVSYNCH, que consiste na administração de GnRH seguido de aplicação de PGF_{2α}, 7 dias após. Em seguida, um segundo tratamento com GnRH é feito 48 horas após a aplicação de PGF_{2α}, sendo a transferência de embriões em tempo fixo realizada 7 dias depois. A administração de GnRH induzirá um pico de LH, resultando na ovulação ou luteinização do folículo

dominante e emergência de uma nova onda de crescimento folicular nos próximos 2 dias, enquanto isso, a administração de $PGF_{2\alpha}$ induz a luteólise (BÓ *et al.*, 2004). A Figura 11 ilustra o esquema do protocolo OVSYNCH.

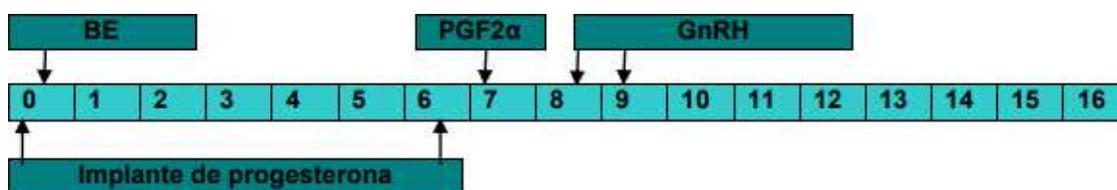
Figura 11 - Protocolo de sincronização OVSYNCH.



Fonte: Penitente Filho *et al.* (2014).

Apesar das opções descritas acima, o tratamento com estrógeno e progesterona tem sido cada vez mais empregado em programas de sincronização do estro em bovinos de leite e de corte. Este protocolo consiste na inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona e na administração de estrógeno no dia 0 do protocolo, a fim de induzir a emergência de uma nova onda de crescimento folicular. No dia 7, 8 ou 9 do protocolo, ao retirar o dispositivo de P_4 , aplica-se $PGF_{2\alpha}$, e subsequente aplicação de estradiol após 24 h ou de GnRH/LH após 48 a 54 h, para a sincronização da ovulação (BÓ *et al.*, 2004). A Figura 12 ilustra o esquema de protocolo de sincronização de fêmeas receptoras utilizando P_4 , E_2 e GnRH.

Figura 12 - Protocolo de sincronização da ovulação com associação de Progestágeno, BE e GnRH.

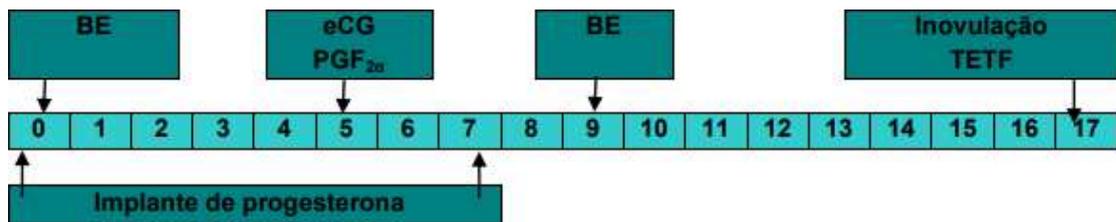


Fonte: Penitente Filho *et al.* (2014).

Também se tem empregado o uso de eCG no dia da retirada do dispositivo intravaginal de P_4 e da aplicação de $PGF_{2\alpha}$, com o intuito de aumentar o rendimento dos protocolos hormonais. Devido à sua dupla ação de FSH e LH, o eCG permite uma melhor maturação folicular e aumento na síntese de progesterona pelo corpo lúteo

formado posteriormente (CHAVES; ALVES, 2014). A Figura 13 esquematiza o protocolo de sincronização utilizando eCG.

Figura 13 - Protocolo de TETF, usando Novormon® (eCG) e inovulação no D17, sem detecção de cio.



Fonte: Penitente Filho *et al.* (2014).

Portanto, a manipulação do ciclo estral das receptoras possibilita melhorar os resultados da TE, já que se torna possível ter um CL funcional no momento da inovulação, aumentando a concentração plasmática de P₄ e, conseqüentemente, consegue-se um ambiente mais propício para manter a gestação (FILHO *et al.*, 2013). Após a seleção e preparo da fêmea receptora, realiza-se a TE ou inovulação, que consiste na deposição do embrião no terço médio-final do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, através de aplicador, semelhante ao utilizado na inseminação artificial. Contudo, somente embriões classificados como grau I a III devem ser transferidos para receptoras (PENITENTE FILHO *et al.*, 2014).

5. CONCLUSÃO

A transferência de embriões é uma biotecnologia aplicada à reprodução animal amplamente difundida no mundo. A partir desta técnica é possível produzir um número elevado de descendentes geneticamente superiores por fêmea, além de reduzir o intervalo entre gerações e aumentar a velocidade de melhoramento genético do rebanho. A TE ainda permite que animais geneticamente superiores e com distúrbios reprodutivos adquiridos se reproduzam, impedindo o descarte precoce deles. Contudo, diversos fatores podem interferir no sucesso da TE, tais como nutrição dos animais selecionados, manejo sanitário e mão de obra da equipe envolvida no procedimento, além da habilidade técnica do Médico Veterinário (a). Portanto, é necessário que todos estes fatores, tanto relacionados aos animais quanto aos profissionais, sejam apropriados, a fim de obter eficiência na técnica em questão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, R.H. *et al.* Transfer of bovine blastocysts derived from short-term in vitro culture of low quality morulae produced in vivo. **Reproduction of Domestic Animals (OnlineEarly Articles)**, 2007.

ALVES, N. G. *et al.* Atividade Ovariana em Fêmeas Bovinas da Raça Holandesa e Mestiças Holandês x Zebu, Durante Dois Ciclos Estrais Normais Consecutivos. **R. Bras. Zootec.**, v. 31, n. 2, 2002.

ANDRADE, J. C. O. *et al.* Use of steroid hormone treatments prior to superovulation in Nelore donors. **Animal Reproduction Science**, v. 69, n.1-2, p. 9-14, 2002.

BARROS, C. M. *et al.* Tratamentos superestimulatórios utilizados em protocolos para a transferência de embriões bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, 2007.

BARUSSELI, P. S. *et al.* **Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo.** Biotecnologia de reprodução em bovinos (3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada). 2008.

Disponível em:

<https://edisdisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4411603/mod_resource/content/1/Importancia_do_emprego_da_eCG_em_protocolos_de_sin%281%29.pdf>. Acesso em: 05 de set. 2021.

BINELLI, M. *et al.* Anti-luteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p.1451-1463, 2001.

BÓ, G. A. *et al.* Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, 32 (Supl): p.1-22, 2004.

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

CHAVES, D. F.; ALVES, M. J. **Protocolo de receptoras de embriões: índices de aproveitamento de corpo lúteo e taxa de prenhez.** Disponível em:

<http://nippromove.hospedagemdesites.ws/anais_simposio/arquivos_up/documentos/artigos/24e86ba499d0ef87bb84ab19053fd2c9.pdf>. Acesso em 29 de agosto de 2021.

DALCIN, L.; LUCCI, C. M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 34, n. 3, p. 149-159, 2010.

DANTAS, K. S. A. *et al.* Seleção de receptoras em um programa de transferência de embriões (PIVE) em bovinos no nordeste do Brasil. **Ciência Animal**, v. 28, n. 1, 2018.

DA SILVA, Emanuel Isaque Cordeiro. **Fisiologia Clínica do Ciclo Estral de Vacas Leiteiras: Desenvolvimento Folicular, Corpo Lúteo e Etapas do Estro**. 2020.

DA SILVA, Emanuel Isaque Cordeiro. **Fisiologia da Reprodução de Bovinos Leiteiros: Aspectos Básicos e Clínicos**. Emanuel Isaque Cordeiro da Silva, 2022.

DA SILVA, Emanuel Isaque Cordeiro. **Transferência de Embriões nos Animais e a Indústria de Embriões no Brasil**. 2020.

DEMÉTRIO, D. G. B. **Colheita e transferência de embriões bovinos**. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus de Botucatu, São Paulo, 2003.

FILHO, L. C. C. *et al.* Fatores que interferem na eficiência reprodutiva de receptoras de embrião bovino. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.**, v. 16, n. 2, p. 201-208, 2013.

FURTADO, D. A. *et al.* Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano IX, n.16, 2011.

GONÇALVES, P. B. D. *et al.* **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal** - 2ª Edição. Roca, 2014.

GONZÁLEZ, F. H. D. **Introdução a Endocrinologia Reprodutiva Veterinária** - UFRGS. 2002. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/lacvet/site/wp-content/uploads/2017/05/endocrino_rep_vet.pdf>. Acesso em: 08 de agosto de 2021.

GOODHAND, K. L. *et al.* In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v. 51, p. 951-961, 1999.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ed. Barueri: Manole, 2004.

HONORATO, M.T. *et al.* Importância da escolha de receptoras em um programa de transferência de embriões em bovinos. **PUBVET**, v. 7, n. 19, 2013.

HOPPER, R. M. Bovine Reproduction. **Wiley Blackwell**, Capítulo 78, p. 723-733, 2015.

International Embryo Transfer Society. **Manual of the International Embryo Transfer Society**. 4th edition, 2010.

INTERVET INTERNACIONAL. **Compêndio de Reprodução Animal**. 2007.

Disponível em:

<<https://www.bibliotecaagptea.org.br/zootecnia/sanidade/livros/COMPENDIO%20DE%20REPRODUCAO%20ANIMAL.pdf>>. Acesso em: 08 de agosto de 2021.

KONIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido**. Vol.2. Porto Alegre: Artmed, 2004, 400p.

MARTINS, F. S. *et al.* Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 32, n. 1, p. 36-49, 2008.

MELLO, R. R. C. *et al.* Desenvolvimento folicular inicial em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 37, n. 4, p. 328-333, 2013.

OLIVEIRA, A. F. M. *et al.* Principais hormônios que controlam o comportamento reprodutivo e social das fêmeas ruminantes - Revisão. **PUBVET**, v. 8, n. 3, 2014.

OLIVEIRA, C. S. *et al.* Biotécnicas da Reprodução em Bovinos. **EMBRAPA**, 2014.

PASA, C. Transferência de embriões em bovinos. **Biodiversidade**, v. 7, n. 1, 2008.

PENITENTE FILHO, J. M. *et al.* Produção de embriões bovinos *in vivo* e *in vitro*. **Revista CFMV**, Ano XX, p. 73-82, 2014.

PHILLIPS, P. E.; JAHNKE, M. M. Embryo Transfer (Techniques, Donors, and Recipients). **Vet Clin Food Anim**, 2016.

RODRIGUES, J. L.; BERTOLINI, M. Biotecnologias da reprodução animal: de Aristóteles à edição gênica. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 43, n. 2, p. 204-208, 2019.

SANTOS, G. M. **Transferência de embriões**. Viçosa: Cpt, 2012.

SANTOS, K. J. G. *et al.* Biotecnologias reprodutivas e fisiologia reprodutiva da fêmea bovina – conhecimento para o sucesso. **PUBVET**, v. 6, n. 36, 2012.

SANTOS, P. H. **Impactos da superestimulação ovariana sobre a diferenciação das células da granulosa bovina**. Dissertação de Mestrado em Farmacologia e Biotecnologia – UNESP. 2017. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/150618/santos_ph_me_bot_int.pdf?sequence=6&isAllowed=y>. Acesso em: 05 de set. 2021.

SEIDEL, G. E. J.; SEIDEL, S. M. **Training manual for embryo transfer in cattle**. Fort Collins: Fao Animal Production And Health Paper, 2005.

SILVA, P. R. B. *et al.* Regulação farmacológica do ciclo estral de bovinos. **PUBVET**, v. 5, n. 39, 2011.

SPELL, A. *et al.* Evaluating recipients and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 287-299, 2001.

TECNOPEC. **Sincronização e Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) em Bovinos**. p.16, 2002.

VALLE, E. R. O ciclo estral de bovinos e os métodos de controle. **EMBRAPA**, 1991.

VIANA, J. H. M. Classificação de embriões bovinos produzidos *in vivo*. **EMBRAPA**, 2009.

VIANA, J. H. M. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. **O Embrião**, ano XVI, edição 51, p. 6- 10, 2012.

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**, p. 65, 2001.

YOUNGS, C. R. **Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle**, p. 267-284, 2007.