



UNICEPLAC
CENTRO UNIVERSITÁRIO

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO PLANALTO CENTRAL APPARECIDO DOS SANTOS
- UNICEPLAC
CURSO DE MEDICINA VETERINARIA

SUPER ESTIMULAÇÃO OVARIANA EM BOVINOS – REVISÃO
DE LITERATURA

GAMA - DF

2022

PEDRO HENRIQUE ANDRÉ DA SILVA

**SUPER ESTIMULAÇÃO OVARIANA EM BOVINOS – REVISÃO
DE LITERATURA**

Trabalho de conclusão de curso para avaliação no componente curricular TCC, Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac, na área de Reprodução de bovinos.

Orientadora: Profa. Dra. Mariane Leão Freitas

GAMA-DF

2022

PEDRO HENRIQUE ANDRÉ DA SILVA

SUPER ESTIMULAÇÃO OVARIANA EM BOVINOS – REVISÃO DE LITERATURA

Trabalho de conclusão de curso para avaliação no componente curricular TCC, Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos – Uniceplac, na área de Reprodução de bovinos.

Gama-DF, 10 de novembro de 2022

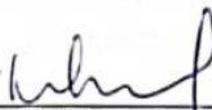
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Mariane Leão FFreitas
Orientadora



Prof. Me. Luiz Fernando de Oliveira Varanda
Examinador



Prof. Me. Tulio César Néves
Examinador

RESUMO

O objetivo do presente trabalho é comparar protocolos de superovulação em bovinos, destacando os principais hormônios materiais necessários, fisiologia reprodutiva e manejo dos animais subordinados. A Superovulação (SOV), consiste em gerar estímulos aos folículos para que desencadeie em ovulações de um mesmo grupo através da administração de hormônios, onde os ovócitos serão fecundados no ambiente uterino da doadora. Por meio de lavagem uterina, faz-se a coleta dos embriões que serão transferidos para vacas receptoras que irão passar por todo o período de gestação e parto. Diferentes protocolos de superovulação podem ser utilizados dependendo categoria dos animais, devendo se avaliar as particularidades dos animais e da propriedade ao se estabelecer o protocolo. Um dos principais hormônios utilizado na SOV é o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) sendo ele o hormônio que ira de fato modificar a fisiologia do animal estimulando um grupo de folículos a ovularem. Essa técnica pode sofrer algumas variações devido a alguns quesitos como a pureza do FSH que pode influenciar as respostas dos protocolos devido a concentração mais elevada de LH, de acordo com método que foi utilizado para purificar o hormônio pode causar ovulações prematuras. Alguns protocolos podem auxiliar em questão de ganhar tempo. A ablação folicular é um método físico que pode ser feito pela punção guiada por ultrassom através da fossa paralombar ou por acesso transvaginal. Este método se baseia em puncionar o folículo dominante para que ocorra o imediato zeramento da onda. Para se ter sucesso na transferência de embrião (TE) é de muita importância as qualidades morfológicas dos embriões, é necessária uma rigorosa avaliação para selecionar os que apresentam uma boa evolução morfológica pois irá incidir diretamente no índice de prenhes.

Palavras-chave: superovulação, protocolo hormonal, transferência de embrião

ABSTRACT

The objective of the present work is to compare superovulation protocols in cattle, highlighting the main necessary material hormones, reproductive physiology, and management of subordinate animals. Superovulation (SOV) consists of generating stimuli to the follicles to trigger ovulations in the same group through the administration of hormones, where the oocytes will be fertilized in the uterine environment of the donor. By means of uterine lavage, embryos are collected to be transferred to recipient cows that will go through the entire gestation and parturition period. Different superovulation protocols can be used depending on the category of animals, and the particularities of the animals and the property must be evaluated when establishing the protocol. One of the main hormones used in SOV is Follicle Stimulating Hormone (FSH), which is the hormone that will actually change the physiology of the animal by stimulating a group of follicles to ovulate. This technique may undergo some variations due to some issues such as the purity of FSH can influence the responses of the protocols due to the higher concentration of LH, according to the method that was used to purify the hormone, it can cause premature ovulations. Some protocols can help in terms of saving time. Follicular ablation is a physical method that can be performed by ultrasound-guided puncture through the paralumbar fossa or by transvaginal access. This method is based on puncturing the dominant follicle so that the wave is immediately zeroed. In order to be successful in embryo transfer (ET) the morphological qualities of the embryos are very important, a rigorous evaluation is necessary to select those that present a good morphological evolution as it will directly affect the pregnancy rate.

Keywords: superovulation, hormonal protocol, embryo transfer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Folículos submetidos a superovulação.....	12
Figura 2. Protocolo hormonal para superovulação usando como base o cio natural da doadora de embriões.....	15
Figura 3. Protocolo hormonal para superovulação usando como base o protocolo de inseminação artificial em tempo fixo.....	16
Figura 4. Protocolo hormonal para superovulação após ablação folicular.....	17
Figura 5. Ilustração de técnica de lavagem uterina.....	18
Figura 6. Imagem de sonda de foley acoplada ao mandril e balão inflado por seringa.....	19
Figura 7. Rastreamento e seleção de embriões.....	20
Figura 8. Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo de acordo com a qualidade morfológica.....	21
Figura 9. Ilustração de envase de embrião.....	22
Figura 10. Protocolo de IATF para a sincronização das fêmeas receptoras.....	24

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Resultados encontrados após a colheita de embriões em doadoras Gir Leiteiro submetidas a diferentes doses de FSH.....	14
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BE - Benzoato de Estradiol

BSA - Bovine Serum Albumin

CL - Corpo Lúteo

eCG - Gonadotrofina Coriônica Equina

ED - Embriões degenerados

EV - Embriões viáveis.

FD - Folículo Dominante

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

IA - Inseminações Artificiais

IATF - Inseminação Artificial em Tempo Fixo

IM - Intramuscular

LH - Hormônio Luteinizante

M - Manhã

OV - Ovócitos

PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato

PGF₂ α - Prostaglandina F2 Alfa

P4 - Progesterona

SOV - Superovulação

TE - Transferência de Embrião

T - Tarde

UNICEPLAC - Centro Universitario do Planalto Central Aparecido dos Santos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1. Fisiologia reprodutiva.....	9
2.2. Doadoras	10
2.3. Superovulação	11
2.4. Hormônio folículo estimulante (FSH)	12

2.5.	Protocolos hormonais para superovulação	14
2.6.	Lavagem uterina e posicionamento da sonda	17
2.7.	Rastreamento e seleção de embriões	19
2.8.	Avaliação de embriões	20
2.9.	Envase e inovulação	22
2.10.	Receptoras	22
3.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
4.	REFERENCIAS	25

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a demanda de carne para o Brasil e exterior está intensificada e algumas técnicas tem ajudado a suprir esta demanda, no sentido de aumentar a eficiência da produção animal, contribuindo assim com a economia e uma maior disseminação de oferta de alimentos. A técnica de seleção onde se consegue animais geneticamente superiores, sendo eles mais produtivos e férteis, quando utilizados em biotécnicas reprodutivas onde pode ser encurtada a obtenção de genética superior, podendo obter um ganho de tempo considerável, uma vez que é necessário esperar várias gerações para que se consiga um animal selecionado. (RULF et al., 2004).

Dentre as biotecnias a superovulação (SOV) ou super estimulação ovariana, consiste em estimular a ovulação de vários folículos de um mesmo grupo através da administração de hormônios, onde os ovócitos serão fecundados no sistema reprodutivo da fêmea doadora e transferido para uma fêmea receptora que levará a gestação a termo, sendo selecionados os genes da vaca doadora, que serão introduzidos na população do rebanho. (BARUSELLI et al., 2006).

A primeira técnica de transferência de embriões com sucesso foi realizada em 1951 em uma universidade dos Estados Unidos, Universidade de Cornell. Onde essa técnica era cirúrgica, e só na década de 70 passou a ser feita por via transcervical, o que ajudou no desenvolvimento da técnica. A superovulação foi criada para o melhor aproveitamento da técnica de Transferência de Embrião (TE), com a maior produção de embriões por animal. (KANAGAWA et al., 1995).

A técnica de superovulação tem uma certa variação do número de embriões produzidos independente de submeter diferentes protocolos a resposta é variável. O Hormônio Folículo Estimulante (FSH) tem sua fonte de produção localizada na hipófise anterior agindo no estímulo do recrutamento e desenvolvimento folicular e na secreção de estradiol. (VISINTIN et al., 1999).

Os produtos disponíveis no mercado e mais utilizados no Brasil no presente momento são: Folltropin-v (Vetoquinol Saúde Animal, São Paulo, Brasil) de acordo com o fabricante, é um extrato de Folitropina altamente purificado, obtido através de seleção de glândulas pituitárias suínas. Preparados anteriores de FSH, mostravam grande quantidade de Hormônio Luteinizante (LH) e grande variação na relação LH:FSH. A partir da purificação e procedimentos de controle de qualidade usados na preparação do medicamento comercial Folltropin-v a baixa relação de LH:FSH são asseguradas. O outro produto comercial é o Pluset (CEVA Saúde Animal, São Paulo, Brasil), que, de acordo com o seu fabricante é uma mistura de gonadotrofinas hipofisárias suínas, com relação definida e constante para obtenção

de ovulações múltiplas (superovulação). O FSH extraído apresenta quantidades variáveis de LH, o qual, se presente em excesso, reduz o rendimento do tratamento, provavelmente favorecendo o processo de atresia dos folículos em desenvolvimento.

Ao extrair o FSH ele entra em contato com o LH. Devido a quantidade de LH contida no hormônio FSH ser variável tem influência com a variação de folículos que iram responder ao protocolo. Altas concentrações de LH presente no FSH causam ovulações prematuras ou luteinização de folículos. (VISINTIN et al., 1999). No intuito de gerar uma melhor resposta no tratamento de superovulação tem se feito alguns protocolos diferentes como o protocolo de ablação folicular onde é feita a punção física do folículo dominante. (LIMA, 2007).

Há um substituto para o FSH que seria a gonadotrofina coriônica equina (eCG) tendo um custo mais acessível é um hormônio produzido pelos cálices endometriais de éguas age e na produção de FSH e LH. (FILHO, 2011). Como vantagens em relação ao FSH, tem uma facilidade bem maior quando comparado com FSH pois é administrado em dose única, outras vantagens são: baixo custo e facilidade de obtenção, porem suas desvantagens estão diretamente ligadas a sua performance, quando utilizado em SOV seus resultados são heterogêneos, existe uma grande variação entre as partidas, seu tempo de meia vida é longo, tem uma predisposição à causar cistos, número alto de embriões degenerados e apresenta níveis de LH em sua composição. (RULF et al., 2004).

O presente trabalho tem como objetivo comparar informações sobre os métodos utilizados em protocolos de superovulação em bovinos, destacando os principais hormônios utilizados, materiais necessários, fisiologia reprodutiva e manejo dos animais subordinados à técnica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FISIOLOGIA REPRODUTIVA

Em bovinos, vacas e novilhas apresentam quatro fases em seu ciclo estral proestro, estro, metaestro e diestro. O período de proestro é o momento que antecede o estro propriamente dito, tendo sua duração de dois a três dias e tem como característica a redução dos níveis de progesterona e aumento dos níveis de estrógeno. Nesta fase ocorre um aumento da liberação de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), ele é produzido pelo hipotálamo, órgão localizado na base do cérebro, e regula a liberação das gonadotrofinas FSH e LH. O FSH e o LH, produzidos pela hipófise anterior, são responsáveis pelo desenvolvimento folicular. (VALLE, 1991).

A crescente quantidade de produção de estradiol é devido ao desenvolvimento do folículo dominante. Quando o estradiol atinge seu pico de produção o comportamento de estro é manifestado pelo animal. Durante o estro o animal tem comportamentos típicos deste estágio, comportamento de cio, tais como: movimentação, aceita monta por outras vacas ou bois, perseguição a outros bovinos, liberação de muco cristalino pela vulva e diminuição da ingestão de alimento. (CUNNINGHAM, 2001).

A fase luteal se dá início após a fase de estro, onde se divide em metaestro e diestro. O metaestro tem duração de no máximo quatro dias e se caracteriza por ser o período entre a ovulação e a formação do corpo lúteo (CL) no local do folículo ovulado, o CL é responsável pela produção de progesterona e pela manutenção da gestação. Após quatro dias da ovulação o CL passa a ser funcional, produzindo altos níveis de progesterona onde temos a fase de diestro, que dentre as fases do ciclo estral é a que possui maior período de duração em torno de 13 dias. (CUNNINGHAM, 2001).

Para a manutenção do CL no ovário é necessário haver fecundação e reconhecimento materno da gestação e assim, os níveis de progesterona se manterão elevados. Caso o reconhecimento materno da gestação não ocorra, o CL irá regredir por meio da ação de prostaglandina F2 alfa (PGF2 α) produzida pelo endométrio, conseqüentemente, diminuindo os níveis de progesterona e permitindo assim o início de um novo ciclo estral e findando a fase de diestro. (VALLE, 1991).

Geralmente vacas possuem apenas uma ovulação por ciclo, podendo apresentar uma, duas ou três ondas de crescimento folicular por ciclo estral. Após o estro, uma onda folicular emerge nos primeiros três dias, podendo ser produzidos em média de 10 a 50 folículos neste grupo, cada folículo tem entorno dois a três milímetros. Em alguns dias esses folículos aumentam seu tamanho para quatro a seis milímetros neste mesmo grupo, alguns folículos continuam crescendo restando cerca de dois a cinco folículos maiores, pelo menos um deles se tornará dominante, enquanto todos os outros irão regredir, fazendo com que essa onda inicie sua atresia. (BÓ et al., 2002).

Normalmente em uma onda folicular os folículos passam por um processo de seleção, entre recrutamento e dominância, onde o folículo que passe a ser dominante terá dois possíveis destinos, se houver a presença de CL terá a presença de altas concentrações de progesterona, e este folículo dominante entrará em atresia, mas caso o CL sofra uma luteólise o folículo dominante não passará pelo processo de atresia, possivelmente chegando à uma ovulação caso tenha o estímulo através da liberação de LH. Porém se não ocorrer uma fecundação do oócito ovulado, o ciclo estral iniciará novamente. (BINELLI; TRENTINARO; BISINOTTO, 2006).

2.2. DOADORAS

Para a seleção de doadoras são escolhidas fêmeas que de alguma forma venham contribuir para o ganho genético, devem ter as características superiores à média de produtividade encontrada no rebanho, pois assim multiplica-se qualidade. Necessário avaliar suas características zootécnicas estabelecidas como: pedigree com boas linhagens, premiação e méritos próprios ou de sua linhagem, produção (carne ou leite) e fenótipo, análise de estado corporal, devem estar sadias e com bom escore corporal. O exame ginecológico é de suma importância, sendo que as doadoras não devem estar gestantes e com um período de pós-parto de pelo menos 45 dias com ciclicidade normal, ausência de infecções e histórico de problemas reprodutivos. (SANTOS, 2012).

De acordo com Baruselli et al, 2006 o descarte de animais que apresentam defeitos anatômicos é importante, evitando assim que sejam passados para sua prole defeitos patológicos de etiologia genética. Assim como animais com defeitos adquiridos devem ser descartados defeitos como: aderência de útero, de ovário, ou de tuba uterina influenciando diretamente na técnica impedindo a coleta de embriões e até mesmo passagem de gametas. As doadoras podem ser superovuladas a cada 40 dias sendo que após terem sido submetidas a técnica por duas vezes essas

fêmeas precisam ser emprenhadas pois o tratamento pode causar um desbalanço a nível hormonal. (HASLER, 2003).

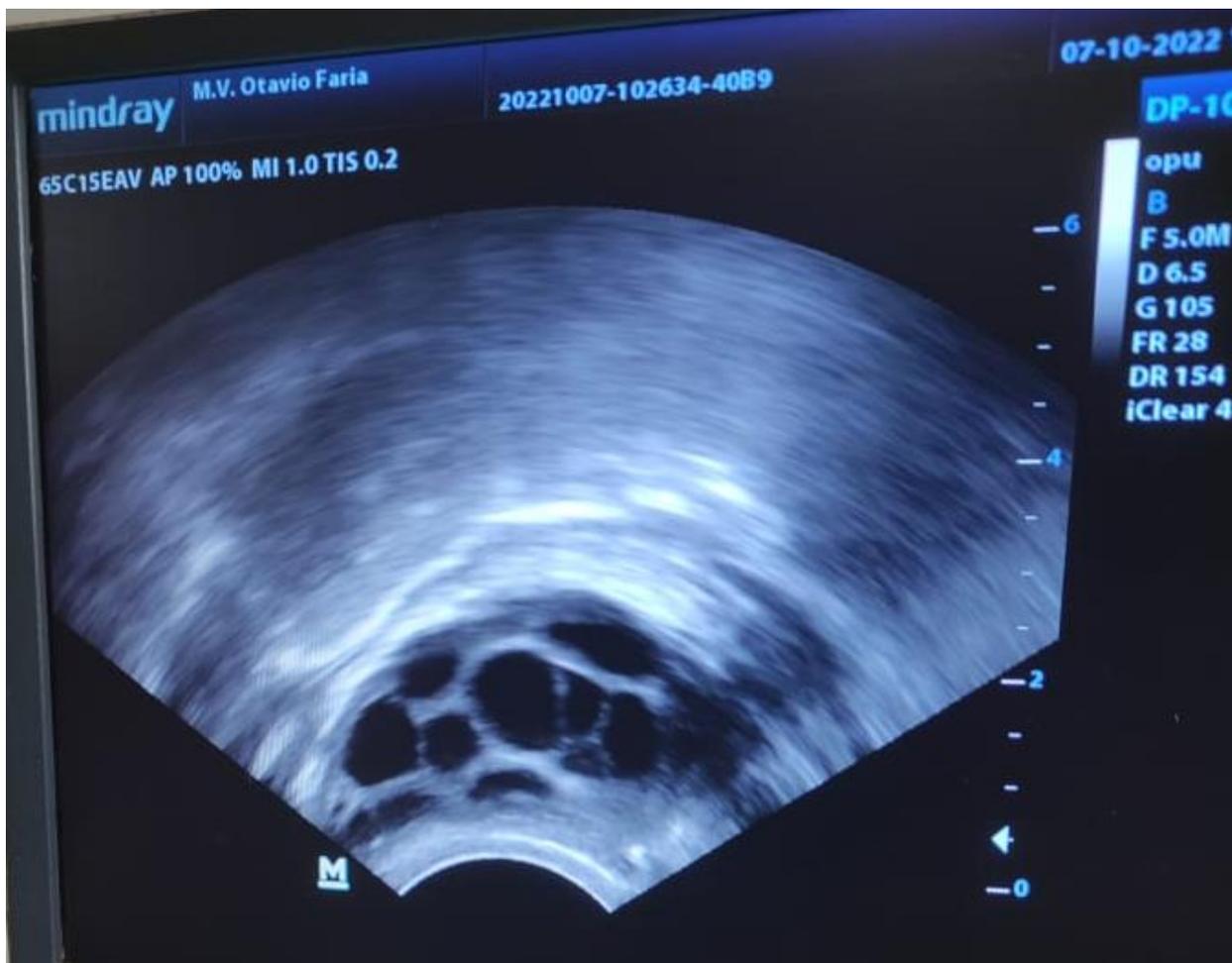
2.3. SUPEROVULAÇÃO

A seleção de animais de genética superior, desencadeou fatores de aumento de produção, como no caso de bovinos, sendo direcionados para a produção de carne e leite, em condições naturais estes animais produzem no máximo apenas uma cria por ano. Ao longo dos tempos criaram-se técnicas que proporcionaram diminuir o intervalo de parições, ferramenta que aumentou a quantidade de produções de embriões, utilizando uma técnica de múltiplas ovulações, elevando o número de crias geradas por ano. (AMARAL et al., 2004).

Através da administração dos hormônios exógenos para a superovulação, ocorrerá o desenvolvimento de diversos folículos com capacidade de ovulação (figura 1), estes folículos pertencem a uma onda de desenvolvimento que em um ciclo normal sem a aplicação de FSH exógeno, entrariam em atresia. Com a suplementação hormonal fornecemos a diversos folículos a capacidade de ovular, não gerando assim um desgaste reprodutivo da doadora. Dentro dos protocolos de superovulação existe uma variação individual de resposta aos tratamentos, sendo este um dos pontos críticos no contexto da SOV. (MARTINEZ; SOUZA, 2007).

Em protocolos hormonais para a SOV são utilizados dispositivos hormonais para a manipulação da onda folicular, os protocolos tradicionais são compostos por progesterona, estradiol, gonadotrofinas (FSH e LH), e prostaglandina (PGF 2α). A manipulação de implantes de progesterona intravaginais associados a aplicação intramuscular de estrógeno induz a atresia folicular e desenvolve o surgimento de uma nova onda. Mas com o intuito de evitar que apenas um folículo se transforme em dominante, faz-se consorciação com doses decrescentes de FSH, gerando uma maturação de vários folículos. Após o protocolo de super estimulação ovariana as doadoras devem ser inseminadas ou levadas a monta natural em um tempo previamente estipulado (BÓ et al., 2010). De seis a oito dias após a ovulação, por meio de lavagem uterina, faz-se a coleta dos embriões que serão transferidos para vacas receptoras de embrião que irão passar por todo o período de gestação, parto, amamentação até o desmame do bezerro. (SANTOS, 2012).

Figura 1. Folículos submetidos a superovulação



Fonte: Arquivo pessoal, 2022

2.4. HORMONIO FOLICULO ESTIMULANTE (FSH)

O FSH tem sua fonte de produção localizada na hipófise anterior agindo no estímulo do recrutamento e desenvolvimento folicular e na secreção de estradiol. Mesmo ao utilizar protocolos de superovulação idênticos em bovinos é extremamente variável o número de embriões coletados após a aplicação da técnica de SOV, isso pode ser atribuído a fatores de cada indivíduo. A aplicação de FSH deve ter intervalos entre aplicações de 12 horas e ser realizada em um período de 4 a 5 dias. Este intervalo é estabelecido devido ao tempo de meia vida do FSH, tendo cerca de 110 minutos, é considerado curto. A concentração plasmática de FSH possui aumento imediato e chegando a um pico em 3 horas após a aplicação intramuscular (IM), e após o pico inicia um declínio gradual até acabar seu efeito com 12 horas após a aplicação. (VISINTIN et al., 1999).

A pureza do FSH pode influenciar as respostas dos protocolos de SOV devido a concentração mais elevada de LH, de acordo com método que foi utilizado para purificar o hormônio pode ocasionar em ovulações prematuras. Outro ponto de influência seria o estado ovário e suas estruturas no início do protocolo pois pode ser um fator determinante, devido algumas características ovarianas como dominância folicular, tamanho folicular e as condições dos folículos antrais podem afetar a resposta ovulatória frente ao tratamento hormonal. (VISINTIN et al., 1999).

A gonadotrofina coriônica equina (eCG) é utilizada como substituto mais acessível do FSH, tendo um custo-benefício melhor é um hormônio produzido pelos cálices endometriais de éguas age e na produção de FSH e LH. (FILHO, 2011). Como vantagens em relação ao FSH, este hormônio tem uma facilidade bem maior quando comparado com FSH pois é administrado em dose única, outras vantagens são: baixo custo e facilidade de obtenção, porém suas desvantagens estão diretamente ligadas a sua performance, quando utilizado em SOV seus resultados são heterogêneos, existe uma grande variação entre as partidas, seu tempo de meia vida é longo, tem uma predisposição à causar cistos, e número alto de embriões degenerados (RULF et al., 2004).

Vacas zebuínas possuem em seu trato reprodutivo estruturas como ovários, folículos e corpos lúteos menores que vacas taurinas, devido a essas características, zebuínos são mais sensíveis aos tratamentos hormonais de superovulação quando comparados as raças taurinas, sendo um fator que pode estar diretamente relacionado a uma exigência de concentrações de FSH menores para uma resposta superovulatória. (PRADO; TONIOLLO; OLIVEIRA, 2007).

De acordo com Santos (2012) em animais taurinos para que se obtenha uma resposta frente a superovulação, deve-se estabelecer doses totais entre 180 e 400 mg de FSH. No entanto para animais zebuínos as doses devem ser mais baixas do que as doses para taurinos as doses devem ser menores que 200 mg de FSH.

Nos animais submetidos a protocolos de superovulação, é indicada a administração de doses decrescente de FSH ao tratamento, visto que este manejo tem como objetivo camuflar a queda fisiológica de FSH durante a fase folicular e visando uma melhor resposta a superovulação. (FILHO, 2011). A Tabela 1 apresenta um exemplo de protocolo hormonal que pode ser empregado em vacas taurinas para se obter a superovulação de doadoras de embriões através de aplicação de doses decrescentes de FSH.

Tabela 1 - Resultados encontrados após a colheita de embriões em doadoras Gir Leiteiro submetidas a diferentes doses de FSH

Quant. FSH	ED	OV	EV
500 (UI)	5	18	33
400 (UI)	21	20	65
300 (UI)	13	49	33
Total	39	87	131

Nota: ED: Embriões degenerados; OV: Ovócitos; EV: Embriões viáveis.

Fonte: Adaptado de Rasi, 2005.

Segundo Prado (2007) onde em sua pesquisa demonstrou que mesmo se atender a todas as exigências do protocolo, e submeter os animais a diferentes doses de FSH a resposta ainda sofre variações. Diante de um estudo que foram usadas 57 doadoras da raça Gir Leiteiro PO com 400 UI de FSH obtiveram um maior número de embriões viáveis, porém com maior número de estruturas degeneradas.

Doses altas de FSH onde não se atendem ao recomendado pelo fabricante, quando se há uma resposta exagerada, pode acarretar formações de muitos corpos lúteos nos ovários. Onde pode ser observado um número muito alto de folículos que não foram ovulados é um indicativo para que se reduza a dose do FSH ou até mesmo pode o substituir. (RASI, 2005).

Pelo fato de doadoras zebuínas atingirem a capacidade ovulatória antes das vacas taurinas, o protocolo de superovulação de doadoras zebuínas possui alteração no momento da aplicação do LH, sendo aplicado com 12 horas de antecedência e as inseminações artificiais (IA) do que o recomendado para vacas taurinas, isso se dá devido o diâmetro folicular pré-ovulatório de zebuínas serem menores. (FILHO, 2011).

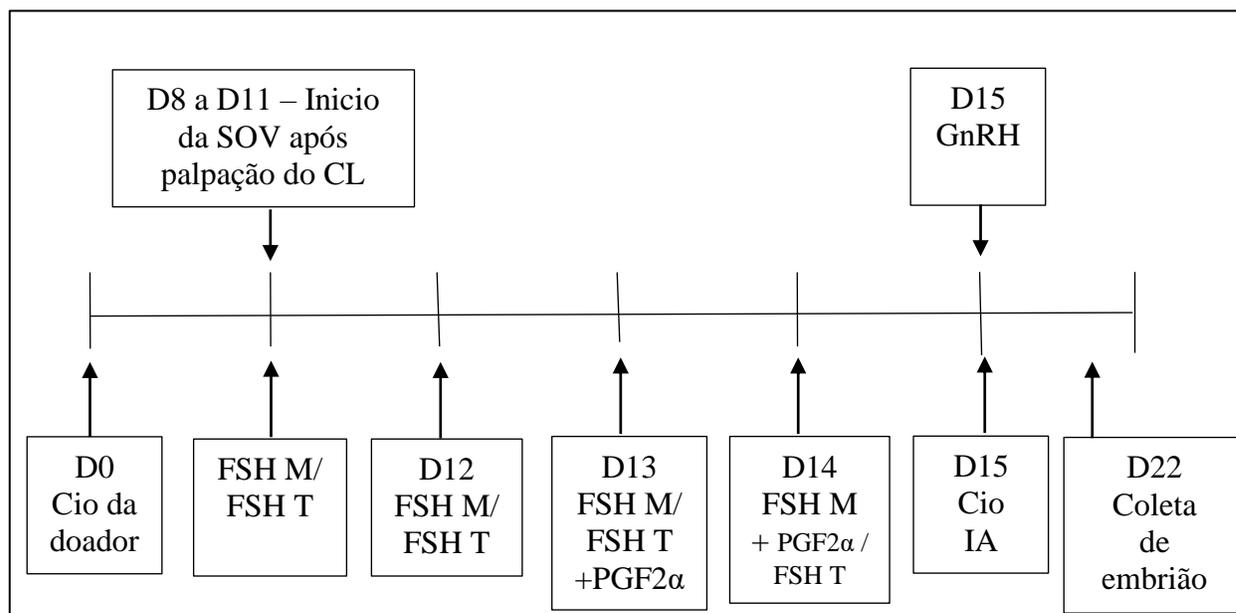
2.5. PROTOCOLOS HORMONAIIS PARA SUPEROVULAÇÃO

Diferentes protocolos de superovulação podem ser utilizados dependendo da raça ou da categoria das vacas que serão submetidas à SOV, devendo se avaliar as particularidades dos animais e da propriedade ao se estabelecer o protocolo. Segundo Filho (2011) tem-se a possibilidade de utilizar um protocolo em vacas ou novilhas, tendo como base um cio natural que é considerado como D0, sete dias após, no D7 essa fêmea apresentou a primeira onda folicular

onde essa primeira onda é descartada devido a segunda onda possuir um maior número de folículos recrutados por volta do dia 8 (D8).

Para iniciar o protocolo (Figura 2) é necessário identificar a fase de corpo lúteo e fase de recrutamento por palpação transretal e ultrassonografia. Após o exame ginecológico, pode dar início ao protocolo onde será administrado oito aplicações de FSH de maneira exógena, as aplicações devem ser feitas de maneira decrescente, iniciando com 40% (D1 da aplicação) - 30% (D2) - 20% (D3) - 10% (D4), cada dose deve ser dividida em duas aplicações sendo administradas metade pela manhã e metade pela tarde Ex.: 40% da dose = 20% pela manhã 20% a tarde, com intervalo de doze horas. No terceiro e quarto dia de aplicação, para que ocorra a lise do corpo lúteo, faz-se a utilização de PGF2 α tendo assim uma queda de progesterona para eliminar o CL, em seguida a doadora vai apresentar cio. Com o intuito de induzir a ovulação o GnRH será utilizado 12 horas após seu uso será feito a inseminação artificial (IA) como indicado no protocolo abaixo. (ADAMS et al., 1992).

Figura 2. Protocolo hormonal para superovulação usando como base o cio natural da doadora de embriões

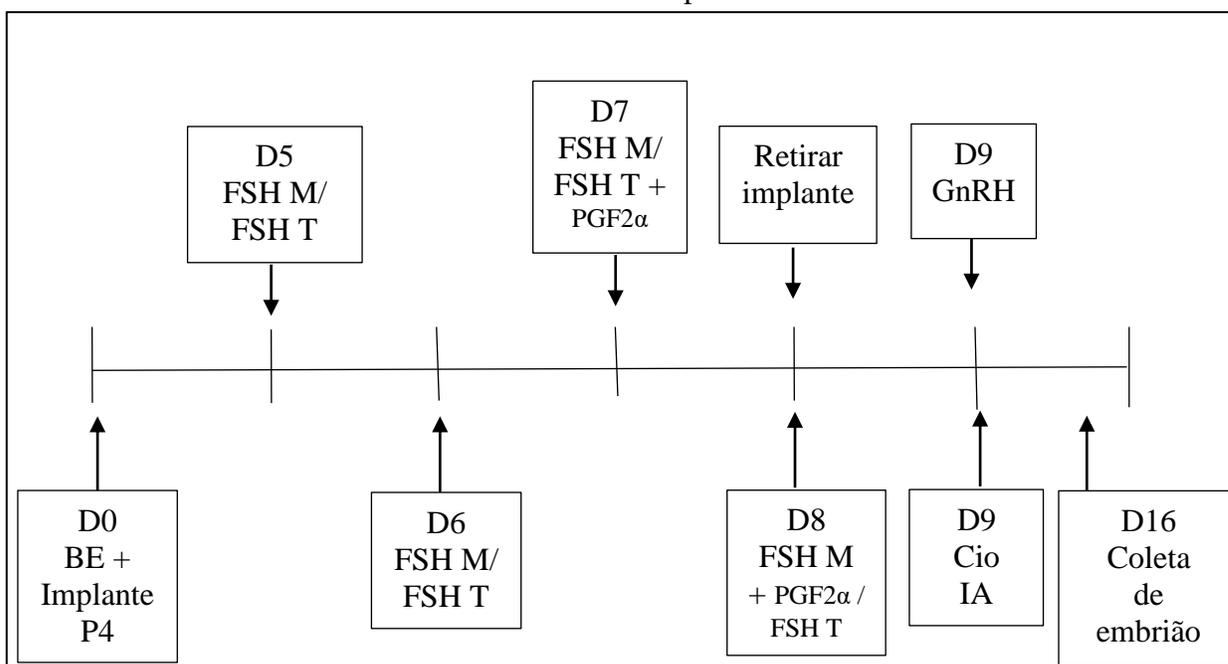


Nota: SOV: Superovulação; CL: Corpo Lúteo; FSH: Hormônio Folículo Estimulante; PGF2 α : Prostaglandina; M: Manhã; T: Tarde; GNRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofina IA: Inseminação Artificial
 Fonte: Adaptado de FILHO et al., 2011.

Um dos protocolos mais utilizados na SOV (Figura 3) tem como base o protocolo utilizado na Inseminação artificial em tempo fixo (IATF), este protocolo consiste em aplicar uma dose de

Benzoato de Estradiol (BE) associado a implante de P4, onde ocorrerá ovulação ou atresia dos folículos subordinados com o intuito de zerar a onda folicular. Cinco dias após no D5 uma nova onda folicular será iniciada, neste momento inicia-se o tratamento para superovulação de fato, com doses decrescentes de FSH durante quatro dias consecutivos. No D7 e D8 do protocolo, é necessária uma dose de prostaglandina para lise do CL eliminando assim a fonte endógena de P4, no D8 para eliminar a fonte exógena de P4, o implante é retirado entrando assim em fase folicular e apresentando cio a partir disto ela terá uma ovulação como não está ovulando não é preciso o GnRH faz-se necessário servido como indutor para ovulação 12 horas após será feita a inseminação artificial e sete dias após a colheita dos embriões (BÓ et al., 2002). Como está indicado na figura a seguir (Figura 3).

Figura 3. Protocolo hormonal para superovulação usando como base o protocolo de inseminação artificial em tempo fixo



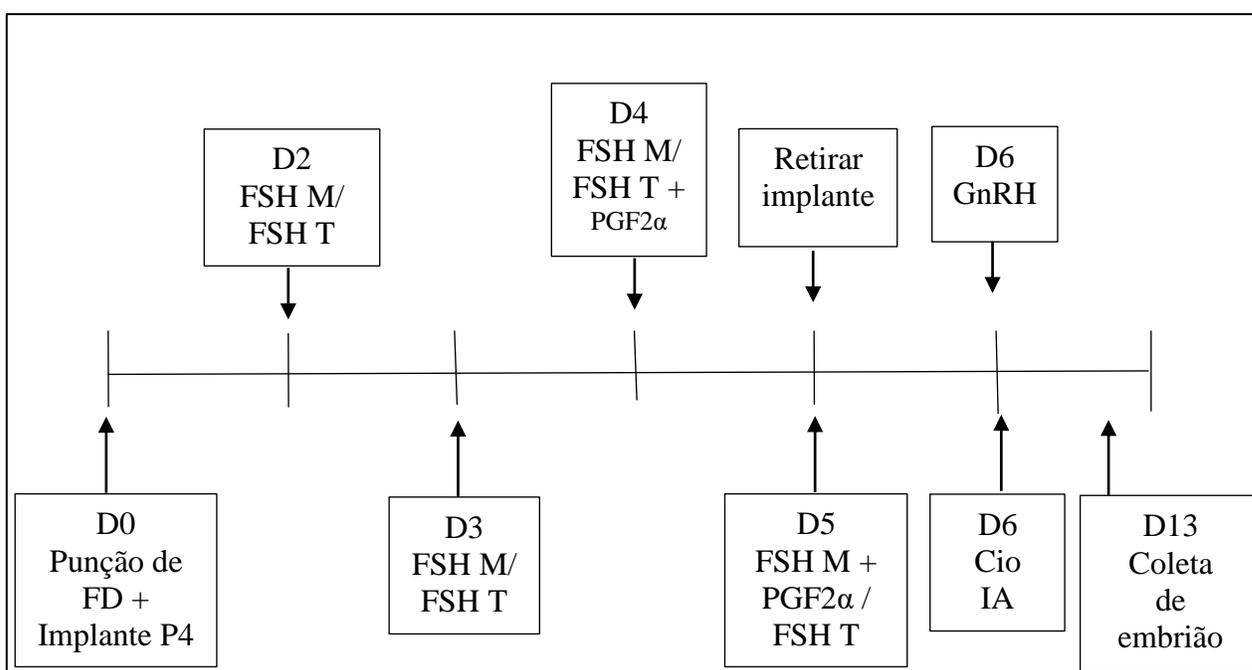
Nota: BE: Benzoto de Estradiol; P4: Progesterona; FSH: Hormônio Foliculo Estimulante; PGF2 α : Prostaglandina; M: Manhã; T: Tarde; GNRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofina IA: Inseminação Artificial.

Fonte: TECNOPEC, 2008.

Protocolos são utilizados para cada momento específico podendo ser adaptados o ponto chave da SOV é o zerar a onda folicular a quebra do mecanismo de dominância folicular antes do início das aplicações é necessária e pode ser realizada por métodos hormonais ou físicos. (BÓ et al., 1995). Para um ganho rápido de tempo a ablação folicular é um método físico que pode ser

feito pela punção guiada por ultrassom através da fossa para lombar ou por acesso transvaginal. Este método (Figura 4) é de importância significativa pois tem uma vantagem de aproximadamente três dias, sob outros protocolos onde o folículo (FD) dominante será puncionado para que ocorra o imediato zeramento da onda. O início do tratamento com FSH vai se dar no D2 com 40% da dose sendo 20% pela manhã e 20% a tarde e assim de maneira decrescente até que chegue a 10% pela manhã e 10% a tarde no D4 e D5 faz-se aplicação de PGF2 α par lise do CL em D6 essa fêmea irá apresentar cio onde será feito GnRH e IA sete dias após a colheita de embriões será feita. (LIMA, 2007).

Figura 4. Protocolo hormonal para superovulação após ablação folicular



Nota: FD: Folículo Dominante; P4: Progesterona; FSH: Hormônio Folículo Estimulante; PGF2 α : Prostaglandina; M: Manhã; T: Tarde; GNRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofina IA: Inseminação Artificial.

Fonte: Adaptado de Lima, 2007.

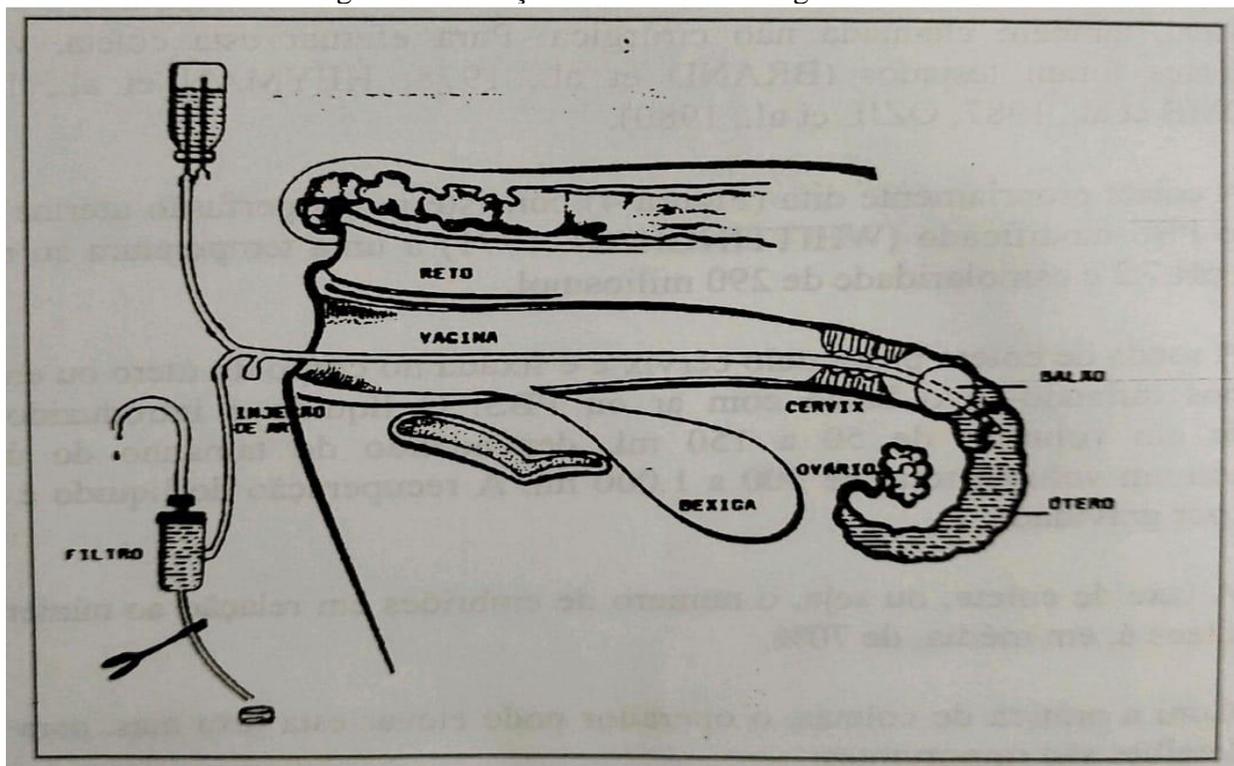
2.6. LAVAGEM UTERINA E POSICIONAMENTO DA SONDA

Para a coleta de embriões faz-se necessário a limpeza da vulva da doadora para que não adentre sujidades no momento da coleta, para facilitar a lavagem uterina de maneira que haja um bom relaxamento do reto realiza-se anestesia epidural com lidocaína 2% a dose pode variar entre 2 a 4 ml. (FILHO, 2011).

Com auxílio de um cateter de silicone sendo necessário que em sua extremidade contenha um balão que irá ser inflado após passar a cérvix do animal, dentro do cateter passa um mandril de metal (Figura 2), para dar sustentação no momento da introdução e posicionamento após a passagem de toda cérvix, posiciona-se o balão onde deve ser inflado com 10 a 20 ml de ar ocorrendo assim uma obstrução da cérvix (Figuras 5 e 6), mas deixando livre a passagem por dentro da sonda, então retira-se o mandril em seguida acopla-se a sonda à um equipo onde em uma extremidade é ligado a um filtro e na outra uma bolsa contendo Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) com temperatura de 37°C. (PRADO, F. R. A.; TONIOLLO, G. H.; OLIVEIRA, J. A., 2007).

Para a lavagem propriamente dita deixe que o PBS adentre todo o útero então feixe o registro ligado a bolsa e abra o que está ligado ao filtro para que o líquido que entrou possa sair, então massageie levemente o útero para que o líquido desça e todas as estruturas fiquem dentro do filtro é necessário que o filtro fique com aproximadamente 3cm de líquido durante a lavagem, após isso segue para o rastreamento dos embriões é necessário repetir esse processo cerca de 10 vezes (FILHO, 2011).

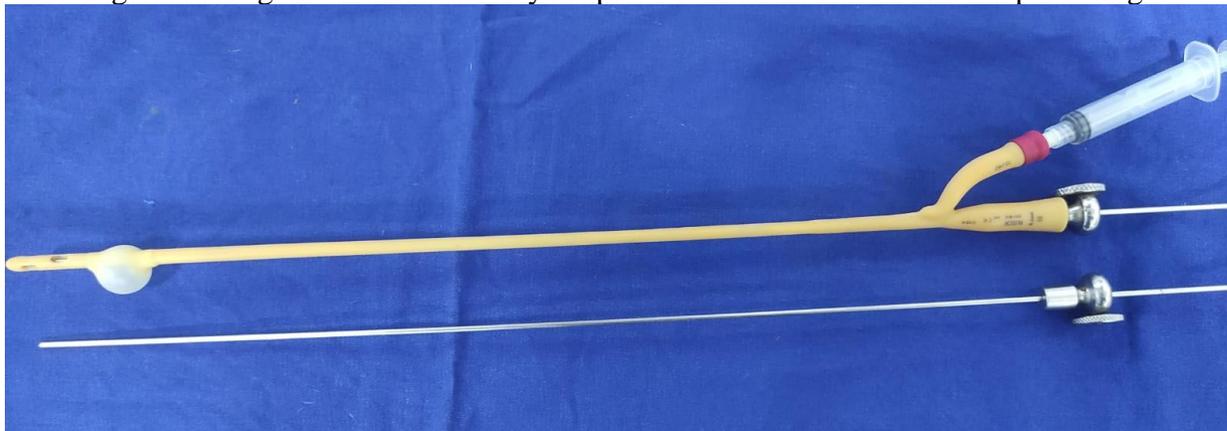
Figura 5. Ilustração de técnica de lavagem uterina



Nota: Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e equina.

Fonte: EMBRAPA, 2004

Figura 6. Imagem de sonda de foley acoplada ao mandril e balão inflado por seringa



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

2.7. RASTREAMENTO E SELEÇÃO DE EMBRIÕES

Após o processo de lavagem uterina, o conteúdo presente no filtro segue para o rastreamento (Figura 7) e classificação dos embriões onde o líquido contendo os embriões e estruturas é armazenado em uma placa de petri, o filtro é lavado utilizando uma seringa de 20 ml contendo PBS, o líquido é esguichado na parede e no fundo filtro e guiado até a placa, para facilitar o rastreamento essa placa é riscada na parte inferior externa, com auxílio de uma lupa estereomicroscópica localiza-se todos os embriões viáveis e inviáveis faz-se a transferência para outra placa de petri com 10 gotas de *Bovine Serum Albumin* (BSA) 0,4% para a lavagem dos embriões é necessário transferi-los de uma gota para outra repetindo esse processo por 10 vezes removendo agentes que possam contamina-los (PRADO, F. R. A.; TONIOLLO, G. H.; OLIVEIRA, J. A., 2007).

Figura 7.
e seleção de



Rastreamento
embriões

Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

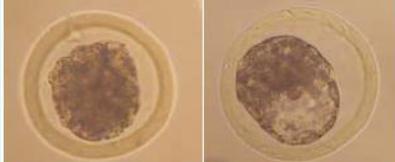
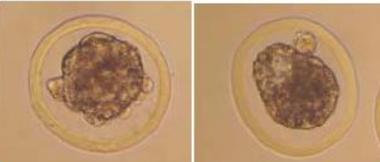
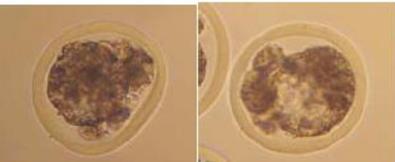
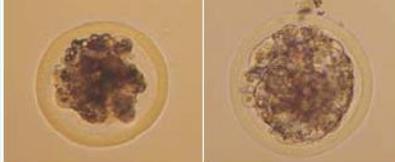
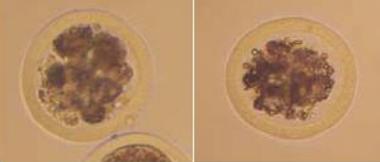
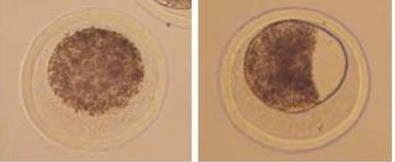
2.8. AVALIAÇÃO DE EMBRIÕES

Normalmente o momento para a colheita dos embriões é no sétimo dia sendo que o dia um corresponde ao dia da ovulação. Após sete dias os embriões já passaram por alguns estágios como: 1° Mórula (aglomerado de células onde os blastômeros podem ser quantificados e sua delimitação distinguida); 2° Mórula compacta (blastômeros não podem ser quantificados e delimitados, algumas vezes é possível achar embriões nesta fase após o lavado) 3° Blastocisto inicial (formação de pequena cavidade chamada blastocelo, circundada de uma compactação de células, este é o estágio da colheita dos embriões no sétimo dia). Após sete dias os embriões seguem alguns estágios sendo o 4° estágio Blastocisto (onde o embrião já ocupa uma boa parte no interior da zona pelúcida, com células mais periféricas); 5° blastocisto expandido (o embrião já ocupa quase todo o interior

da zona pelúcida, deixando apenas uma camada bem fina de zona pelúcida, nessa fase o diâmetro embrionário está aumentado). No nono e decimo dia e zona pelúcida tende a se romper e o embrião sofre um achatamento dificultando o rastreamento este é o 6° estágio chamado de blastocisto eclodido (RULF et al., 2004).

Para se ter sucesso na transferência de embrião (TE) é de muita importância as qualidades morfológicas dos embriões, por isso é necessária uma rigorosa avaliação para selecionar os que apresentam uma boa evolução morfológica pois irá incidir diretamente no índice de prenhes. Algumas características morfológicas têm que ser levadas em consideração como: simetria das células (blastômeros), forma esferoide, nitidez e aparência clara dos blastômeros, coloração uniforme, membrana celular uniforme, embrião tem que estar proporcional ao espaço perivitelino, zona pelúcida íntegra, compactação das células e ausência de vacúolo, conforme apresenta a figura 8. (VIANA, 2013).

Figura 8. 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, picnose, 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>

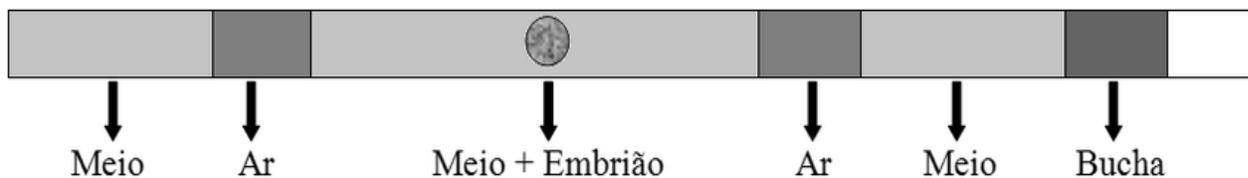
Fonte: Viana, 2013.

2.9. ENVASE E INOVULAÇÃO

Após os processos de avaliação e seleção os embriões precisam ser envasados e sigam para serem transferidos para as receptoras, caso sejam transferidos a fresco os embriões devem sofrer uma manutenção, onde são banhados em PBS + 0,4% de BSA, são realizados cerca de três banhos. Após os banhos seguem para o envase, com a utilização de palhetas de 0,25 ml, onde serão carregadas com meio de manutenção, em seguida cria-se um espaço com ar, novamente meio de manutenção já com o embrião dentro logo após uma nova coluna de ar e completa com meio para que o embrião fique centralizado na palheta separadas por duas colunas de ar, para que não corra o risco de tocar e aderir as extremidades do lacre e do embolo, as palhetas são as mesma utilizada para estocagem de sem porem com um lacre em uma das extremidades, conforme representado na figura 9. (PRADO, F. R. A.; TONIOLLO, G. H.; OLIVEIRA, J. A., 2007).

Para TE é necessário materiais como: inovulador, bainha e camisinha sanitária o método utilizado é não-cirúrgico por ser mais rápido e prático consiste em introduzir a palheta com embrião no inovulador e o mesmo é acoplado à bainha e vestido com a camisinha sanitária, então o faz-se a introdução na vagina da receptora e por palpação transretal o inovulador é guiado até o corno uterino que possui o corpo lúteo onde o embrião será depositado. (BALL; PETERS, 2006).

Figura 9. Ilustração de envase de embrião



Fonte: Filho et al., 2014.

2.10. RECEPTORAS

A seleção de receptoras é um processo em que alguns pontos são considerados de extrema importância como: avaliação de escore corporal, sem excessos e descartando extremos, avaliação se há infestação de endo/ectoparasitas controlada e exame clínico. Ao verificar estes parâmetros os animais considerados adequados passam por exames de ultrassonografia transretal para que sejam

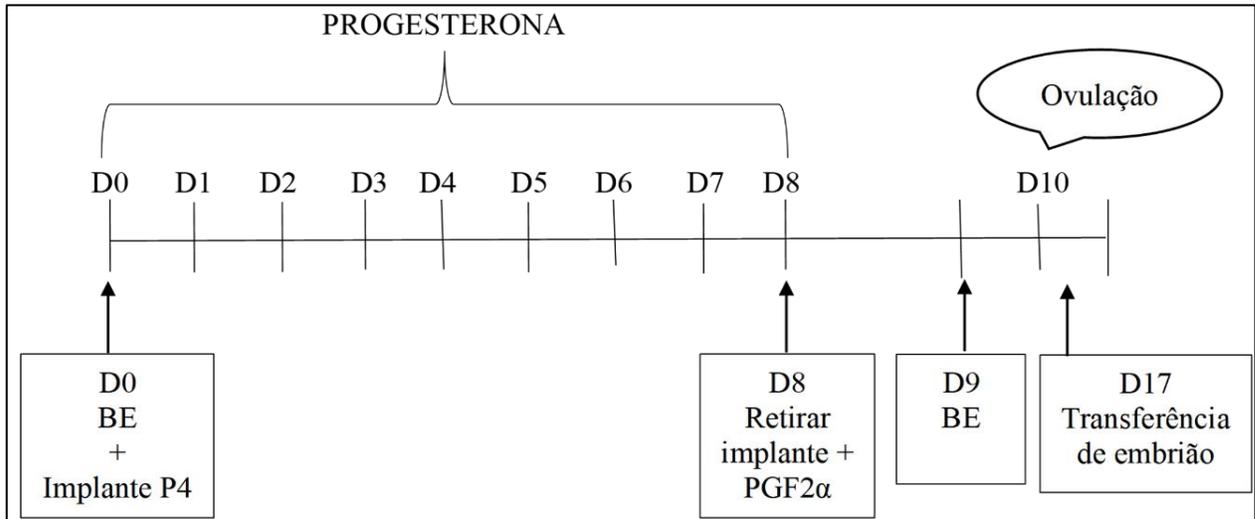
efetivadas como potenciais receptoras e sigam com um futuro protocolo hormonal de sincronização. (BALL; PETERS, 2006).

A utilização mais precisa é a de receptoras cruzadas, utilizando uma raça zebuína e uma taurina, necessário que sejam jovens, tendo uma boa capacidade de conversão alimentar, selecionando as de alta fertilidade e boa habilidade materna, ideal escolher animais que já tenham histórico de gestações anteriores. Não se faz necessário mantê-las para apenas uma finalidade, o reaproveitamento destes animais, favorece o proprietário por não ter a necessidade fazer a compra de novas receptoras. Porém, a cada novo protocolo deve-se reavaliar os animais de forma individual. (FILHO, 2011).

Para que se tenha sucesso em todo o protocolo de superovulação, é necessário que a receptora esteja em sincronia de ciclo estral com as doadoras, as receptoras de embrião devem ter apresentado sinais de estro no mesmo dia que as doadoras ou no máximo com intervalo de um dia antes ou um dia depois, não devendo passar deste intervalo. Para que isso se torne possível deve-se utilizar de um protocolo de sincronização. Entretanto se ao fazer o exame de ultrassonografia transretal e indicar o mesmo período cíclico das doadoras ou mesmo se for observado comportamentos de cio indicando sincronia com as doadoras também podem ser utilizados como potenciais receptoras. (BALL; PETERS, 2006).

Para a sincronia entre doadora e receptora é feito um protocolo de IATF (Figura 10). Traçando uma linha do tempo comparando doadora e receptora ambas iniciam juntas no D0, a receptora irá iniciar o protocolo com implante de progesterona e dose de benzoato de estradiol esta fêmea permanecerá com o implante até o D8 onde será retirado e aplicado uma dose de PGF2 α , para lise de CL por consequência apresentará cio. No D9 uma dose de Benzoato de estradiol é repetida para induzir a ovulação que ocorrerá no D10 para que se forme um novo CL para que o útero esteja banhado de progesterona no momento que o embrião for transferido para o corno uterino desta receptora que será sete dias após a ovulação D17. (BÓ et al., 2004).

Figura 10. Protocolo de IATF para a sincronização das fêmeas receptoras



Fonte: Adaptado de BÓ et al., 2004.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou que a SOV é uma técnica que permitiu encurtar gerações e agilizar o processo de seleção, a biotecnologia se mostrou variável diante das categorias de raça e idade das doadoras. Entretanto a técnica utilizada com animais de alto mérito genético se faz eficiente devido ao alto custo do FSH. Seu substituto (eCG) não se fez vantajoso pois existe uma grande variação entre as partidas, seu tempo de meia vida é longo, tem uma predisposição a causar cistos, e número alto de embriões degenerados. Os protocolos se mostraram mais eficientes quando destinados para a individualidade de cada animal.

A taxa de concepção da técnica é ligada a seleção e classificação de embriões devendo ser minuciosa avaliando todas as qualidades morfológicas do embrião o que aumentou a taxa reprodutiva. Outro ponto que pode ser considerado negativo, é em relação ao tempo que se há entre um protocolo e outro e o tempo que a doadora ficará gestante, ou seja, só podem ser feitos dois ou três protocolos nessa doadora e emprenhá-la, ficando assim mais de nove meses sem poder utilizar a técnica nesta fêmea.

Para uma melhor resposta aos protocolos a utilização de hormônios estimulantes de crescimento folicular mais puros sem "contaminação" por LH, a técnica teria menos variáveis.

4. REFERÊNCIAS

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. Association between surges of folliclestimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journals of Reproduction & Fertility**, v.94, p.177-188, 1992.

AMARAL, B.C.; SOUZA, J.C.; BERTECHINI, A.G.; VIVEIROS, A.T.; TEXEIRA, J.C.; ARANTES, A.F.A. Efeito de diferentes dosagens de vitamina A injetável na produção e qualidade de embriões bovinos da raça Nelore. **Ciências Agrotécnicas**, v. 28, n. 3, p. 662-667, 2004

BALL, P. J. H.; PETERS, A R. **Reprodução em Bovinos**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2006. 232 p.

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F.; NOGUEIRA, M. F.; BARROS, C. M.; BÓ, G. A. Superovulation and embryo transfer in *Bos taurus indicus* cattle. **Departament of Animal Reproduction, FMV-USP**. São Paulo-SP, v.7. n. 65, p. 77-88. Jan. 2006.

BINELLI, M.; TRENTINARO B.; BISINOTTO R. Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. **Acta Scientiae Veterinariae**, São Paulo, p.1-7, 2006.

BÓ, G.A.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32 p.1-22, 2004.

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

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Exogenous control of follicular wave emergency in cattle. **Theriogenology**, v. 43, p. 31-40, 1995.

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

FILHO, J. M. P.; OLIVEIRA, F. A.; JIMENEZ, C. R.; TORRES, C. A. A. Produção de embriões bovinos in vivo e in vitro. 2011. **Monografia (Especialização)** – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

HASLER, J.F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.79, n.3, 2003, p.245-264.

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

LIMA W. M. Resposta superovulatória após ablação folicular usando um dispositivo simplificado em bovinos (*Bos taurus taurus*). **Acta sci Vet.** Porto Alegre, 2007.

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

PRADO, F. R. A.; TONIOLLO, G. H.; OLIVEIRA, J. A. Superestimulação ovariana em vacas da raça gir leiteiro com uso de diferentes concentrações de FSH: ovarian superstimulation in gir leiteiro cows with different concentrations of fs. **Ars veterinária**, jaboticabal, v. 3, n. 23, p.172-177, 2007.

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

Rumpf R, Brandão DO, Pereira DC, Correia GA. Vitriificação de embriões produzidos in vitro **Workshop**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; 2004.

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

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

VIANA, J. H. M. **Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo** (2013). Disponível em: <https://pt.engormix.com/pecuaria-leite/artigos/classificacao-embrioes-bovinos-produzidos-t37792.htm>. Acesso em: 30 setembro 2022.

VISINTIN, J.A.; ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H.; MIZUTA, K.; CELEGHINI, E. C.C.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D.; GUSMÕES, P. P.; CANDINI, P.H. Superovulação de novilhas da raça Nelore com diferentes doses de FSH/LH e congelação de embriões pelo método one-step com etilenoglicol. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 5, p.1-11, 1999.