



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DE ALGUNS ASPECTOS DA CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS
DA RAÇA FRÍZIA HOLSTEIN NA ROTINA DE UMA UNIDADE DE TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÕES

PAULO BOTELHO RESENDES RODRIGUES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PROFESSOR DOUTOR LUÍS LOPES DA COSTA

PROFESSORA DOUTORA LUÍSA MATEUS

DOUTOR JOÃO NESTOR DAS CHAGAS E SILVA

DR. JOSÉ PEDRO BRAVO DE AZEVEDO

ORIENTADOR:

Dr. JOSÉ PEDRO BRAVO DE AZEVEDO

CO-ORIENTADOR:

DOUTOR JOÃO NESTOR CHAGAS E SILVA

2011

LISBOA

i



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ESTUDO DE ALGUNS ASPECTOS DA CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS
DA RAÇA FRÍSLIA HOLSTEIN NA ROTINA DE UMA UNIDADE DE TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÕES

PAULO BOTELHO RESENDES RODRIGUES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PROFESSOR DOUTOR LUÍS LOPES DA COSTA

PROFESSORA DOUTORA LUÍSA MATEUS

DOUTOR JOÃO NESTOR DAS CHAGAS E SILVA

DR. JOSÉ PEDRO BRAVO DE AZEVEDO

ORIENTADOR:

Dr. JOSÉ PEDRO BRAVO DE AZEVEDO

CO-ORIENTADOR:

DOUTOR JOÃO NESTOR CHAGAS E SILVA

2011

LISBOA

À minha Mãe,
o meu pilar e o meu orgulho.

Agradecimentos:

Ao Doutor Nestor Chagas e Silva, pela transmissão de conhecimentos, com muita dedicação, seriedade e sinceridade. Pela disponibilidade que apresentou para se deixar acompanhar, tanto no continente como nas ilhas e, sobretudo, pela honestidade com que sempre me tratou, tanto a nível pessoal como profissional.

“Raciocínios complexos não passam da soma de raciocínios simples”

Ao Dr. José Pedro Bravo de Azevedo, pela orientação do meu estágio, por me ter proporcionando trabalho de campo intensivo a nível da reprodução em bovinos, pelos conhecimentos transmitidos e, sobretudo, por me inculir alguns ensinamentos pessoais, fundamentais para se ser bem sucedido, os quais farei questão de não esquecer.

“A chave do sucesso é 1% de inspiração e 99% de transpiração”

Ao meu orientador e co-orientador o meu obrigado sincero, pois fizeram com que voltasse a ter vontade de ser Veterinário. Espero, com o tempo, demonstrar-vos a minha gratidão.

“Quando o esperto decide, só ele beneficia. Quando o inteligente decide, todos beneficiam”

À Bárbara por me ter apoiado incondicionalmente ao longo de todo o estágio.

Aos amigos que, segundo um professor de Filosofia, “...são a família que nós escolhemos”. O meu muito obrigado por me fazerem recordar estes seis anos com um sorriso rasgado e com muitas histórias para contar.

“Recebe bem e serás bem recebido”

Aos meus irmãos, pela cumplicidade, palavras amigas e pelo apoio.

Ao meu pai e minha mãe, por toda a dedicação, paciência e amor. Espero um dia poder dar-vos tudo o que bem merecem.

“O sonho comanda a vida”

Aos meus tios pelo apoio, carinho, motivação e, sobretudo, pelo exemplo que são para mim.

Ao meu padrinho João Maria. É um grande desgosto não poder partilhar a minha “vitória académica” com uma das pessoas mais extraordinárias que conheci.

À Dra. Carolina Câmara, Directora do Matadouro Regional da Ribeira Grande, pela permissão dos treinos de transferência e recolha de embriões nos animais da abegoaria.

RESUMO

A primeira parte desta tese faz uma abordagem sobre generalidades da transferência de embriões (TE) em bovinos leiteiros, como a sua história e evolução, vantagens e desvantagens da técnica, caracterização de dadoras e receptoras, protocolos de tratamentos superovulatórios (TS), avaliação da resposta superovulatória (RS), sincronização de cios, estratégias de beneficiação da dadora particularizando a utilização de sêmen sexado, referência a factores que podem influenciar a RS, descrição de técnicas como a de recolha, manipulação e avaliação embrionária e TE.

A segunda parte foca o tema da criopreservação embrionária. Faz um resumo histórico da sua evolução, menciona a sua importância, faz a descrição dos princípios criobiológicos, dos crioprotectores e dos procedimentos de congelação.

A terceira parte do trabalho constitui a componente experimental da tese, que resultou da análise retrospectiva de dados referentes à TE de uma equipa licenciada (denominada de equipa A) cuja actividade foi desenvolvida na região de Entre Douro e Minho e Beira Litoral. Avaliou-se a fertilidade global da equipa A e tentou analisar-se até que ponto, factores como o intervalo de tempo entre o final da recolha e o início da congelação, ou a época do ano em que foram realizadas as recolhas e as transferências embrionárias, poderiam influenciar a viabilidade do embrião transferido.

Os resultados dos ensaios mostraram que as novilhas eram significativamente ($p < 0,05$) melhores receptoras de embriões do que as vacas, sendo estas últimas um sério factor de risco aquando da sua utilização como receptoras.

À medida que o intervalo de tempo final da recolha-início da congelação aumentava, houve tendência numérica para a diminuição da TG. Porém, as diferenças não foram significativas ($p > 0,05$).

O stress hipertérmico parece afectar a TG, quer nas novilhas, quer nas vacas, sobretudo quando as recolhas/congelação e as TE são realizadas nos meses quentes. No entanto, não houve diferenças significativas com o grupo controlo ($p > 0,05$).

Palavras Chave: Superovulação, Holstein-Frísia, criopreservação, stress hipertérmico, intervalo final da recolha-início da congelação.

ABSTRACT

The first part of this thesis is a general approach to embryo transfer (ET) in dairy cattle, including its history and evolution, advantages and disadvantages of the technique, characterization of donors and recipients, superovulatory treatment protocols (ST), evaluation of superovulatory response (SR), synchronization of estrus, strategies for improvement of donor mating, particularly by the use of sexed semen, reference to factors that may influence the SR, description of techniques such as collection, handling, embryonic evaluation and ET.

The second part focuses on the issue of embryo cryopreservation. It summarizes the historical evolution of this technique, mentions its importance, describes the cryobiologic principles, the cryoprotectors and procedures of freezing.

The third part of the work consists of the experimental component of the thesis, which resulted from the retrospective analysis of data on ET collected by a licensed team (designated by team A) whose activity was developed in the region of Entre Douro e Minho and Beira Litoral. We evaluated the overall fertility of team A and tried to analyze to what extent factors such as the time interval between the end of the collection and the beginning of the freezing, or the time of the year in which the collections and the embryo transfers were made could influence embryo viability after the transfer. The test results showed that the heifers were significantly ($p < 0.05$) better recipients than the cows.

With the increase of the time interval between the end of the collection and the beginning of freezing, there is a tendency of reduction of the PR, however the differences are not significant ($p > 0.05$).

The hyperthermic stress appears to affect the PR, both in heifers and cows, especially when the collection / freezing and ET are held in warm months, however, no significant differences with the control group were found ($p > 0.05$)

Keywords: Superovulation, Holstein-Friesian, cryopreservation, hyperthermic stress, interval end collection - initiation of freezing.

ÍNDICE GERAL

RESUMO.....	V
ABSTRACT	VI
ÍNDICE GERAL	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABELAS.....	XII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	XIII
1 GENERALIDADES SOBRE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (TE) EM BOVINOS LEITEIROS.....	1
1.1 DEFINIÇÃO E CONCEITO DE TE	3
1.2 VANTAGENS DA TE	6
1.2.1 Progresso genético	6
1.2.2 Controlo sanitário	7
1.3 SELECÇÃO DAS DADORAS.....	8
1.3.1 Valor genético	8
1.3.2 Idade.....	8
1.3.3 Condição corporal	8
1.3.4 Lactação	8
1.3.5 Hereditariedade.....	8
1.3.6 Fertilidade/saúde reprodutiva	9
1.4 SELECÇÃO DAS RECEPTORAS.....	9
1.4.1 Vaca vs novilha	9
1.4.2 Sanidade e exame físico	9
1.5 SUPEROVULAÇÃO	10
1.6 FISILOGIA	10
1.7 HORMONAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO SUPEROVULATÓRIO	12
1.7.1 Gonadotrofina coriônica equina.....	12
1.7.2 Anti-eCG	13
1.7.3 Hormona folículo estimulante	14
1.7.4 Menotropina	14
1.7.5 Extracto hipofisário de equino	15
1.8 OUTRAS ESTRATÉGIAS DE TS.....	15
1.8.1 Aplicação única de FSH.....	15
1.8.2 Pré-estimulação ou “priming”	15

1.9	FASE DO CICLO ÉSTRICO EM QUE É FEITO O TRATAMENTO	
	SUPEROVULATÓRIO.....	16
1.9.1	Diestro.....	16
1.9.2	Início do ciclo éstrico.....	16
1.9.3	Utilização de dispositivos de progesterona.....	16
1.9.4	Progesterona e estradiol.....	17
1.10	PREVISIBILIDADE DA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA.....	18
1.10.1	Expressão de cio.....	18
1.10.2	Níveis séricos de P4.....	18
1.10.3	Níveis séricos de estrogénio e de LH.....	18
1.10.4	Hormona antimulleriana.....	19
1.11	SINCRONIZAÇÃO ENTRE DADORA E RECEPTORA.....	19
1.11.1	Importância.....	19
1.11.2	Cio induzido vs cio natural.....	20
1.11.3	Cio natural.....	20
1.11.4	PGF _{2α} ou análogos de síntese.....	20
1.11.5	P4, E2 e PGF _{2α} , com ou sem eCG.....	21
1.11.6	GnRH e PGF _{2α}	22
1.11.7	Sucesso de “Ovsynch” em vacas e novilhas.....	23
1.11.8	“Ovsynch” + dispositivo de progesterona.....	23
1.12	ESTRATÉGIAS DE BENEFICIAÇÃO DA DADORA.....	25
1.12.1	Altura da IA.....	25
1.12.2	IA da dadora com protocolo de IATF.....	25
1.12.3	Qualidade do sémen.....	25
1.13	UTILIZAÇÃO DE SÉMEN SEXADO.....	26
1.13.1	Vantagens.....	26
1.13.2	Desvantagens.....	26
1.14	FACTORES QUE PODEM AFECTAR A RS.....	28
1.14.1	Desenvolvimento de folículos persistentes durante TS.....	28
1.14.2	Relação FSH:LH das preparações superovulatórias.....	28
1.14.3	Somatotropina.....	29
1.14.3.1	Aplicação de r-BST antes do tratamento superovulatório.....	29
1.14.3.2	Aplicação de r-BST na altura da inseminação da dadora.....	29
1.14.3.3	r-BST nas receptoras.....	30
1.14.3.4	r-BST em tratamentos superovulatórios repetidos.....	30
1.14.3.5	Desvantagem da aplicação de r-BST.....	30
1.14.4	Hormona luteinizante.....	30
1.14.5	Tratamentos superovulatórios repetidos.....	31

1.14.6	Factores ambientais e/ou de manejo	31
1.14.7	Nutrição	31
1.14.8	Clima	33
1.15	RECOLHA DOS EMBRIÕES	33
1.15.1	Preparação para a recolha	33
1.15.2	Procedimento de recolha não-cirúrgica.....	34
1.15.3	Variações nas metodologias de recolha	35
1.15.4	Meio de recolha	36
1.15.5	Meio de manutenção	36
1.16	MANIPULAÇÃO DOS EMBRIÕES EM LABORATÓRIO	36
1.16.1	Avaliação dos embriões.....	37
1.16.2	Classificação dos embriões quanto ao estágio de desenvolvimento.....	37
1.16.3	Classificação dos embriões quanto à qualidade	38
1.17	TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES	39
2	CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS	41
2.1	INTRODUÇÃO	43
2.1.1	Princípios criobiológicos.....	44
2.2	PROCEDIMENTO DE CONGELAÇÃO	49
2.2.1	Congelação lenta convencional.....	49
2.2.2	Transferência directa.....	52
2.2.2.1	Transferência directa com glicerol.....	52
2.2.2.2	Transferência directa com etilenoglicol	52
2.2.3	VITRIFICAÇÃO	53
2.2.3.1	Método “Open Pulled Straw”	55
2.2.3.2	Criopreservação de embriões produzidos <i>in vitro</i>	55
3	ENSAIOS EXPERIMENTAIS.....	57
3.1	INTRODUÇÃO GERAL.....	59
3.2	ENSAIO I	60
3.2.1	Material e métodos.....	60
3.2.2	Resultados	62
3.2.3	Discussão e conclusões.....	62
3.3	ENSAIO II	63
3.3.1	Material e métodos.....	63
3.3.2	Resultados	64
3.3.3	Discussão e conclusões.....	64
3.4	ENSAIO III	67
3.4.1	Material e métodos.....	67

3.4.2	Resultados	68
3.4.3	Discussão e Conclusões	68
4	CONCLUSÕES GERAIS	71
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
6	ANEXOS.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação gráfica de ciclos éstricos com duas e três ondas de crescimento folicular	11
Figura 2: Esquema de TS padrão com utilização de eCG	13
Figura 3: Esquema do TS padrão com utilização de FSH	14
Figura 4: Recolha de embriões com sistema fechado ou por gravidade	35
Figura 5: Transferência do meio contendo os embriões do filtro EM-COM para placas de Petri	37
Figura 6: Blastocisto e mórula/jovem blastocisto são os estádios de desenvolvimento esperados em embriões com 7 dias	39
Figura 7: Transferência não-cirúrgica de embrião	40
Figura 8: Representação das variações de temperatura ao logo do tempo, na congelação da água pura, dando ênfase ao calor de fusão	45
Figura 9: Mórula a encolher-se quando apresentada a soluções com concentrações crescentes	46
Figura 10: Aumento da concentração do soluto à medida que a temperatura baixa	50
Figura 11: Rampa de congelação utilizada na criopreservação dos embriões transferidos nos ensaios da componente prática da presente tese	50
Figura 12: Indução de formação de cristais com pinça arrefecida em azoto líquido ("seeding")	51
Figura 13: Esquema de enchimento da mini-palhinha	61
Figura 14: Diagnóstico de gestação precoce por ecografia	62
Figura 15: Intervalo de tempo (horas) entre final da recolha e início da congelação e sua relação com a TG	65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Evolução da TE em mamíferos	4
Tabela 2: Evolução mundial da técnica <i>in vivo</i>	5
Tabela 3: Evolução da técnica <i>in vivo</i> em bovinos em Portugal	5
Tabela 4: Calendarização do TS com utilização de CIDR	17
Tabela 5: Sincronia entre embrião e receptora e taxa de gestação.....	19
Tabela 6: Calendário de ovulação múltipla na novilha dadora e de sincronização de cios das receptoras.....	24
Tabela 7: Relação entre qualidade do sémen utilizado em OMTE e a taxa de fertilização e a qualidade embrionária	26
Tabela 8: Primeiro nascimento após transferência de embriões congelados	44
Tabela 9: Fertilidade global da equipa A.....	62
Tabela 10: Relação entre o intervalo de tempo desde o final da recolha ao início da congelação e a TG.....	64
Tabela 11: Relação entre intervalo de tempo final da recolha e o início da congelação e a TG	65
Tabela 12: Relação entre o intervalo de tempo final da recolha e o início da congelação e a TG	66
Tabela 13: Relação entre a época da recolha e da transferência embrionária e a TG	68

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
®	marca registada
AM	manhã
AMH	hormona antimulleriana
BSA	albumina sérica bovina
BSC	body score condition
BVD	diarreia viral bovina
cc	centímetros cúbicos
CIDR	dispositivo intravaginal (“controlled internal drug release”)
CL	corpo(s) lúteo(s)
CL3	corpo lúteo no estágio 3
CH3	corpo hemorrágico no estágio 3
DMSO	dimetilsulfóxido
E2	estradiol
eCG	gonadotrofina coriónica equina
FCS	soro fetal bovino
FD	folículo dominante
FIV	fertilização <i>in vitro</i>
FSH	hormona folículo estimulante
FSH-p	hormona folículo estimulante suína
GnRH	gonadoliberina
GH	“Growth hormone” (hormona do crescimento)
HAP	extracto hipofisário de equino
hCG	gonadotropina coriónica humana
hMG	menotropina
h	hora(s)
IA	inseminação artificial
IATF	inseminação artificial em tempo fixo

IGF	“insulin like growth factor”
IETS	Sociedade Internacional de Transferência Embrionária
IM	intramuscular
IVP	produção <i>in vitro</i>
LH	hormona luteinizante
M	molar
min	minutos
mg	miligramas
mL	mililitro(s)
OMTE	ovulação múltipla e transferência de embriões
P4	progesterona
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	reação em cadeia da polimerase
PGF_{2α}	prostaglandina F _{2α}
pH	potencial de hidrogeniônico
PM	tarde
PMSG	“pregnant mare serum gonadotrophin”
r-BST	somatotropina recombinante bovina
RI	reflexo de imobilização
RS	resposta superovulatória
TE	transferência embrionária
TG	taxa de gestação
TS	tratamento superovulatório
µg	micrograma(s)
µl	microlitro(s)
ZP	Zona Pelúcida
OPS	“open pulled straw”

1 GENERALIDADES SOBRE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (TE) EM BOVINOS LEITEIROS

1.1 DEFINIÇÃO E CONCEITO DE TE

Classicamente, a transferência de embriões é uma técnica de manejo reprodutivo através da qual um ou vários embriões são recolhidos de uma fêmea designada como dadora e, depois, transferidos para outras fêmeas designadas como receptoras, nas quais decorrerá a gestação até termo. Actualmente, esta definição revela-se pouco precisa. Hoje, e de um modo mais abrangente, a TE é considerada uma técnica reprodutiva através da qual embriões ou oócitos fertilizáveis *in vitro* são recolhidos do tracto genital de uma fêmea (dadora) e, após processamento, são colocados em local adequado do trato genital de fêmeas receptoras previamente seleccionadas, nas quais decorrerá a gestação até termo (Mapletoft, 2006).

Deve-se a George John Romanes (1848–1894) a primeira TE, sem registo de sucesso (Betteridge, 2003).

Mais tarde, Walter Heape em Abril de 1890 foi o primeiro a registar êxito através da TE, utilizando coelhos de raças diferentes para tal efeito. A história desta transferência acabou também por revelar outros aspectos: ficou demonstrado que coelhos de uma dada raça podiam ficar gestantes de coelhos de outra, sem que houvesse interferência do ambiente uterino da receptora (Betteridge, 2003).

Em 1931 foram observados e manuseados os primeiros oócitos bovinos e em 1933 foram igualmente descritas TE bem sucedidas em ratos (Betteridge, 2003).

A primeira TE em bovinos acabou por ocorrer apenas em 1949, realizada por Umbaugh e, o primeiro nascimento de um vitelo através desta técnica ocorreu em 1951 (Betteridge, 2003).

No princípio dos anos 70, a TE surge como técnica de “rotina”, no ramo da bovinicultura quando, bovinos de raças europeias de duplo propósito se tornaram populares na América do Norte, Austrália e Nova Zelândia (International Embryo Transfer Society (IETS) , 1990).

O elevado custo de importação desses animais da Europa e os longos períodos de quarentena que eram exigidos limitavam o número de importações de animais vivos. Desta forma, as entidades envolvidas foram encorajadas a providenciar o capital necessário para garantir a evolução da transferência de embriões de uma técnica de laboratório para uma técnica de campo (IETS, 1990).

A técnica de colheita e transferência de embriões era até ao início dos anos 70, realizada por laparotomia, que frequentemente resultava em situações de fibrose e aderências com a diminuição da capacidade reprodutiva, tanto de dadoras como das receptoras (IETS, 1990).

A partir daí, com o estabelecimento de técnicas não-cirúrgicas de recolha e transferência, a TE passou a revelar menos riscos, tornou-se mais barata, mantendo a sua eficiência (Chagas e Silva, 1991).

Em 1977, o mercado de compra de reprodutores da Europa para a América do Norte caiu abruptamente como resultado da TE. Durante este período de tempo, as técnicas actualizaram-se e os custos foram reduzidos. O desenvolvimento de técnicas de recolha e TE não-cirúrgicas, bem como, a criopreservação de embriões, foram passos notáveis para o sucesso do procedimento (Seidel, 1981).

Tabela 1: Evolução da TE em mamíferos (adaptado de Jainudeen, Wahid, & Hafez, 2000)

EVOLUÇÃO	AUTOR, ANO
nascimento de coelho após TE	Heape, 1890
nascimento de rato após TE	Nicholas, 1933
nascimento de borrego e cabrito após TE	Warwick & Berry, 1949
nascimento de suíno após TE	Kvansnickii, 1951
nascimento de vitelo após TE	Willett et al., 1951
primeira troca intercontinental de embriões preservados a 10°C	Marden & Chang, 1952
primeira companhia comercial de transferência de embriões para espécies pecuárias	Alberta Livestock Transplants Ltd., 1971
nascimento de ratos após transferência de embriões congelados	Whittingham et al., 1972
nascimento de vitelo após transferência de embrião congelado (Frosty II)	Wilmut & Rowson, 1973
nascimento de poltro após TE	Oguri & Tsutaimi, 1974
nascimento de menina através de PIV	Steptoe & Edwards, 1978
nascimento de vitelo após PIV	Brackett et al., 1982
nascimento de búfalo através de TE	Drost et al., 1983
nascimento de borrego clonado de embrião de ovelha com 8 a 10 células	Willadsen, 1986
nascimento de vitelo clonado de mórula de com 9 a 15 células	Prather et al., 1987
nascimento de borrega clonada através de células somáticas de um animal adulto	Wilmut et al., 1996

Com estes progressos, aliados à motivação económica, a utilização das técnicas de recolha, transferência e congelação de embriões tiveram um aumento da procura ao longo dos tempos, em vários países (Seidel, 1981), como está representado na Tabela 2.

Tabela 2: Evolução mundial da técnica *in vivo* (Fonte: www.iets.org)

ANO	RECOLHAS	EMBRIÕES RECOLHIDOS	TE A FRESCO	TE CONGELADOS
1997	82,307	456,258	168,373	192,283
1998	96,177	528,588	220,223	221,072
2000	113,058	664,068	246,256	282,284
2001	101,291	580,077	228,078	221,068
2003	108,166	693,787	290,567	250,228
2004	116,993	691,545	326,978	222,301
2005	130,861	789,972	332,407	279,771

Actualmente, a TE está difundida por quase todo o planeta. Em 2006, mais de 100.000 vacas foram superovuladas e mais de 500.000 embriões bovinos foram transferidos. Cerca de 70% da actividade foi aplicada em animais de aptidão leiteira (Mapletoft, 2006).

Tabela 3: Evolução da técnica *in vivo* em bovinos em Portugal (Fonte: www.aete.eu)

ANO	RECOLHAS	EMBRIÕES RECOLHIDOS	TE A FRESCO	TE CONGELADOS
2004	92	876	342	159
2005	75	692	212	180
2009	28	370	111	103
2010	54	781	175	118

1.2 VANTAGENS DA TE

1.2.1 Progresso genético

A nível de um dado efectivo, a TE permite uma maior intensidade de selecção (maior número de descendentes de um menor número de reprodutoras) e encurtamento do intervalos entre gerações, através da potencialização reprodutiva de fêmeas geneticamente superiores de mérito já confirmado ou previsível (Nicholas, 1996).

Em programas de selecção de touros para IA, a OMTE (ovulação múltipla e transferência de embriões) também começa a estar associada à determinação de mérito genético através de testes genómicos, quer para determinação de génotipos superiores de machos (futuros reprodutores), como das fêmeas (mães desses reprodutores ou colaterais, sujeitas a programas de superovulação). Um reprodutor pode ter a sua prova genómica à nascença e, deste modo, o seu sémen pode começar a ter livre prática, logo que os ejaculados tenham qualidade para serem processados e comercializados. Desta forma, podem ser utilizados touros testados com 3,5 anos, em vez dos 5,5 anos, com os testes de descendência clássicos (Mapletoft, 2006).

A TE permite a obtenção de descendência de elevado mérito que, pela sua idade avançada, já não conseguem manter uma gestação ou de fêmeas pré-púberes, de modo a diminuir o intervalo entre gerações (Nicholas, 1996; Galli et al., 2003).

Enquanto a inseminação artificial (IA) é uma técnica que dissemina o potencial genético dos touros, os programas de OMTE permitem também associar a selecção pelo lado materno, com mais rápida expansão das características desejadas (Nicholas, 1996).

Com a técnica de TE, o progresso genético conseguido é muito mais eficiente a nível de um dado efectivo do que de um país, por não ter uma aplicação massal como a IA (Chagas e Silva, 1991).

A TE permite ainda a possibilidade de introdução de novos génotipos em qualquer país, sem os problemas inerentes ao transporte de animais vivos, a condicionamentos sanitários ou ao custo elevado do transporte (Atwell, 1987; Evans, 1998) e, a preservação de espécies exóticas ou em perigo de extinção, de modo a salvaguardar património genético valioso (Nienhaus, Sacher, Smidt & Niemann, 1990; Lopes da Costa, Chagas e Silva & Robalo Silva, 2001).

Fêmeas de elite que participam em concursos podem gerar descendência sem prejudicar a sua participação nos mesmos, já que os seus embriões podem ser transferidos para receptoras adequadas.

Nas vacas repetidoras (animais que não ficaram gestantes, após terem sido inseminadas 3 ou mais vezes, sem causa aparente) o recurso à TE pode ultrapassar certas causas de infertilidade, tais como falha na fertilização ou morte embrionária precoce principalmente em

períodos de stress hipertérmico (Putney, Thatcher, Drost, Wright & DeLorenzo, 1988; Putney, Drost & Thatcher, 1989; Putney, Drost & Thatcher, 1998; Drost et al., 1999; Armstrong, 2001; Dochi et al., 2008).

1.2.2 Controlo sanitário

Os embriões produzidos *in vivo* são recolhidos por via não-cirúrgica, aos 7-7,5 dias após o cio. Este período de tempo é curto e apenas os agentes patogénicos que podem então estar no tracto genital, poderão causar infecção (Singh, 1988).

O facto de se usarem grandes volumes de meio de recolha, banhos sucessivos em meios de manutenção e a utilização de antibióticos conduz a diluição e diminuição da população microbiana eventualmente presente no útero (Stringfellow & Givens, 2000; Givens & Marley, 2008).

Vários estudos provaram que embriões com zona pelúcida (ZP) íntegra e correctamente lavados, não transmitiam qualquer tipo de doença. No entanto, ainda se colocam algumas dúvidas quanto à diarreia viral bovina (BVD), leptospirose, paratuberculose, ureaplasma ou micoplasma, dado estes agentes poderem promover a infecção intragamética (Guerin, Nibart, Marquant-Le Guienne & Humblot, 1997; Stringfellow, 1998; Wrathall & Suttmoller, 1998; Stringfellow & Givens, 2000).

Como podemos constatar, a lista de vantagens da técnica é muito vasta, contudo é um procedimento dispendioso. Requer mão-de-obra especializada, a utilização de hormonas e outros fármacos, meios de cultura, material descartável e estéril, bem como equipamento de laboratório (lupas, congelador de embriões, material para micromanipulação) (Seidel Jr, 1981).

Para além dos custos mencionados, a variabilidade das resposta superovulatória (RS) é muito grande, o que torna a TE muito mais dispendiosa e de utilização mais limitada que a IA (Alarcón, Galina, Corro & Asprón, 2010).

1.3 SELECÇÃO DAS DADORAS

1.3.1 Valor genético

As vacas e novilhas utilizadas como dadoras de embriões são seleccionadas com base em informações disponíveis no que diz respeito ao seu mérito produtivo ou à performance dos ascendentes (Callesen, Liboriussen & Greve, 1996).

1.3.2 Idade

Novilhas virgens tendem a produzir menos embriões que as vacas jovens (Stroud & Hasler, 2006; Callesen et al., 1996). Contudo, Chagas e Silva, Lopes da Costa e Robalo Silva (2002a) registaram resultados opostos. Por outro lado, dadoras com cerca de 10 anos ou mais, tendem a ter RS mais fracas após tratamento superovulatório (TS) (Lerner et al., 1986; Malhi, Adams, Roger & Singh, 2006; Stroud & Hasler, 2006; Malhi, Adams, Mapletoft & Singh, 2008). Vacas secas têm tendência para produzir maior número de oócitos/embriões que as vacas da mesma idade em lactação, bem como menor número de oócitos não fertilizados (Hasler, Brooke & McCauley, 1981).

1.3.3 Condição corporal

Tem sido observado que dadoras obesas (frequente em vacas que já estão em lactação há muito tempo) tendem a produzir menos embriões por recolha, parecem ter maior predisposição para o desenvolvimento de folículos anovulatórios e produção de oócitos não fertilizados, quando estimuladas (Stroud & Hasler, 2006; Guerra, Rodríguez, Villareal, Albrecht & Brogliatti, 2007).

1.3.4 Lactação

Animais em lactação revelam um elevado metabolismo do estradiol, que é essencial para a fertilização. Para além desta situação, nos períodos do ano de maior calor, as vacas leiteiras apresentam temperatura corporal superior (aproximadamente de 0,2°C), quando expostas ao calor, em comparação aos animais não lactantes.

O stress hipertérmico tem efeito mais evidente em animais em lactação e está associado à degenerescência das células tecais e da granulosa, a oócitos de fraca qualidade, baixa fertilidade e baixa taxa de concepção (Chebel, Demetrio & Metzger, 2008).

1.3.5 Hereditariedade

Para alguns autores (Mapletoft, 2006; Stroud & Hasler, 2006; Monniaux et al., 2010), vacas com boas RS tendem a gerar filhas que irão ter também boas RS, conclusão esta que não é

corroborada por outros (Tonhati, Lôbo & Oliveira, 1999) que atribuem à RS uma baixa hereditariedade.

1.3.6 Fertilidade/saúde reprodutiva

Dadoras saudáveis têm tendência a ter melhores RS, maior taxa de fertilização e produção de maior número de gestações, após transferência dos seus embriões, do que as dadoras consideradas inférteis (Hasler, McCauley, Schermerhorn & Foote, 1983).

1.4 SELECÇÃO DAS RECEPTORAS

As receptoras têm como função fornecer o ambiente uterino adequado ao embrião que acolhem para que este se possa desenvolver e a gestação chegue a termo. A sua selecção é um passo fundamental para o sucesso do programa (Stroud & Hasler, 2006).

1.4.1 Vaca vs novilha

A taxa de gestação após TE, sobretudo em raças leiteiras, é mais elevada nas novilhas do que nas vacas em produção, sobretudo nas de altas produções. Esta é uma decisão económica importante principalmente em vacas leiteiras superovuladas porque estas produzem normalmente menos embriões que dadoras de raça de carne (Stroud & Hasler, 2006; Vasconcelos et al., 2006). Outro factor a ter em conta é o grau de dificuldade de TE nas vacas relativamente às novilhas: há maior probabilidade da transferência ser traumática (após transposição do cérvix) no caso das primeiras, devido à dificuldade da manipulação transrectal de aparelhos genitais de grandes dimensões, o que conduz à diminuição da eficiência da TE em relação às novilhas (Chagas e Silva, Cidadão & Lopes da Costa, 1999). No entanto, segundo Callesen, Liboriussen & Greve, citados por Stroud & Hasler (2006), as vacas, em relação às novilhas, geralmente têm taxas de gestação mais baixas. Porém quando se toma em consideração a viabilidade e sobrevivência da cria, a taxa de sucesso final é da mesma magnitude.

1.4.2 Sanidade e exame físico

As receptoras devem ser sujeitas a um exame físico completo, recolhendo-se informação quanto à existência de doenças infecciosas. Deve ter-se em atenção aspectos como a idade, a condição corporal e sinais de doença. O exame ginecológico através de palpação rectal é imprescindível para detecção de anomalias do tracto reprodutivo que impeçam a sua utilização.

Com este conjunto de informações o técnico responsável deverá tomar a atitude correcta (aprovar, isolar, tratar ou eliminar) (IETS, 1990).

1.5 SUPEROVULAÇÃO

A primeira descrição da técnica de superovulação foi feita em 1927 por Smith e Engle, que aumentaram a taxa de ovulação em murganhos e ratos após a administração de extractos hipofisários de espécies pecuárias (Gordon, 2002).

Entende-se a superovulação como a técnica de estimulação hormonal dos ovários do animal dador para se obterem ovulações adicionais às consideradas normais para a espécie. Tem como objectivo produzir o maior número possível de oócitos que posteriormente serão fecundados e darão origem a uma quantidade máxima de embriões de boa qualidade que serão transferidos para receptoras (Mapletoft, 2006).

O procedimento tem sido sujeito a muito trabalho de investigação durante os últimos 50 anos. Apesar dos muitos progressos na compreensão do crescimento folicular na vaca, a variabilidade das RS das dadoras continua a ser dos factores mais limitantes do sucesso da indústria de TE (Staigmilller et al., 1992; Kohram, Bousquet, Durocher & Guilbault, 1998; Bo et al., 2002; Hasler, Bilby, Collier, Denham & Lucy, 2003).

A utilização de gonadotrofinas combinadas ou não com: GnRH (gonadoliberina), prostaglandinas, progestagénios, estrogénios e somatotropina recombinante bovina (r-BST), não revelou uma evolução significativa no processo de superovulação na vaca, nas últimas duas décadas (Mapletoft, Steward & Adams, 2002).

1.6 FISILOGIA

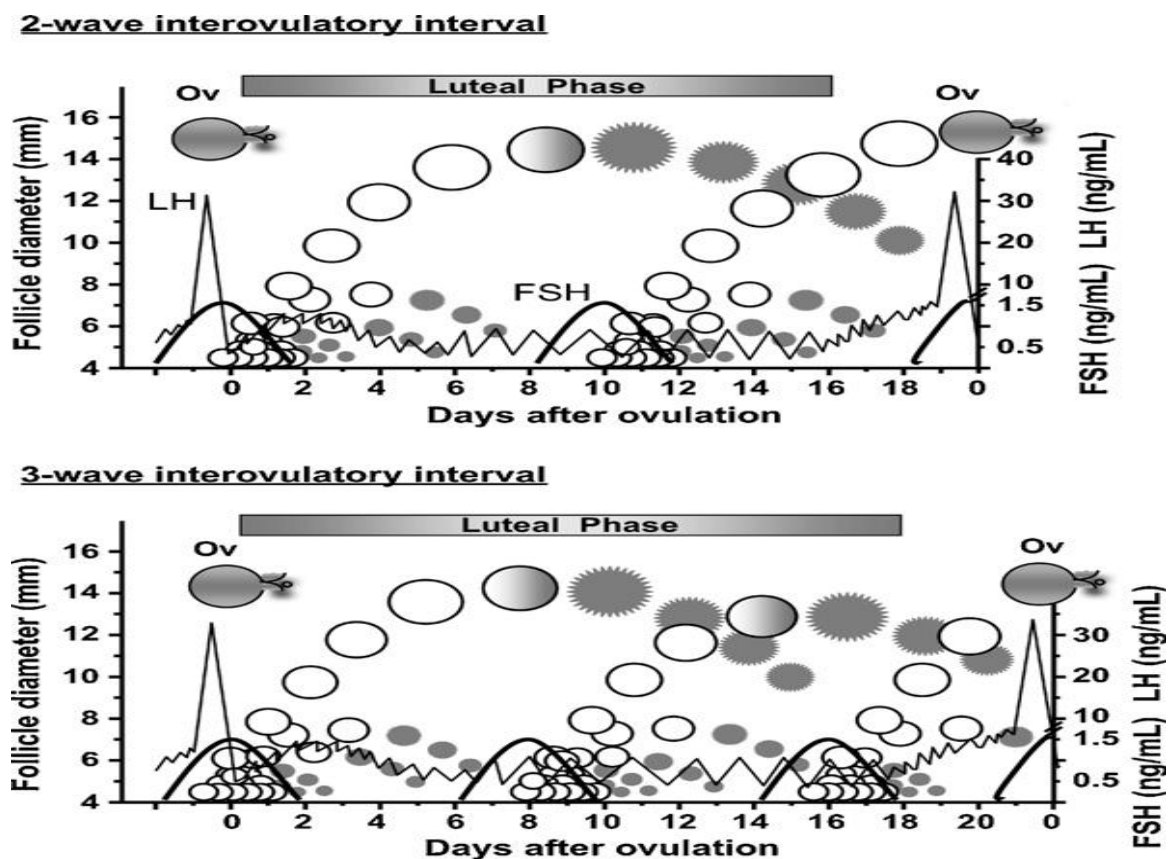
O ciclo éstrico da fêmea bovina é caracterizado por ondas de crescimento folicular (2 ou 3, mais raramente, 4). Durante cada uma dessas ondas, um grupo de folículos antrais (3-5mm), reactivos a gonadotrofinas, é estimulado a iniciar o seu crescimento. Passadas as fases de recrutamento e selecção, surge a emergência do folículo dominante (FD) que continua a crescer e segrega estradiol-17 β , inibina e outros factores que irão causar atresia e regressão dos folículos subordinados por falta de hormona folículo estimulante (FSH). Na presença de corpo lúteo (CL), a progesterona (P4) bloqueia o eixo hipotálamo-hipofisário impedindo o pico de hormona luteinizante (LH), o que tem como consequência que o FD permaneça funcional por alguns dias depois de atingir o seu tamanho máximo, sofrendo em seguida atresia, fazendo baixar a concentração de estrogénios, permitindo assim uma nova onda de crescimento folicular. As ondas de crescimento folicular repetem-se até que o período de dominância folicular coincida com a regressão do CL e então ocorre a ovulação (ver figura 1). O objectivo do TS é estimular o crescimento do maior número possível de folículos antrais (o que só é possível se o início do tratamento coincidir com a emergência

de uma onda de crescimento folicular) para que atinjam todos a fase de dominância (Webb & Armstrong, 1998; Adams, Jaiswal, Singh & Malhi, 2008).

Está provado que a presença de FD no início do TS diminui o recrutamento folicular, a RS e consequentemente o número de embriões recolhidos e a sua qualidade (Huhtinen, Rainio, Aalto, Bredbacka & Maki-Tanila, 1992).

As células da granulosa do FD produzem inibina que em conjunto com o aumento de estrogénios (devido a actividade da enzima aromatase) fazem reduzir a secreção de FSH, o que conduz à atresia dos folículos subordinados. O factor de crescimento insulínico (IGF-I), activina e folistatina parecem ser os responsáveis pelo facto de o FD não regredir, como acontece com os subordinados, aquando da queda da FSH (Wolfsdorf et. al., 1997).

Figura 1: Representação gráfica de ciclos éstricos com duas e três ondas de crescimento folicular (extraído de Adams, Jaiswal & Malhi, 2008)



A remoção mecânica de folículos de maiores dimensões antes do início do TS (dando origem ao crescimento de uma nova onda folicular), tem mostrado resultados satisfatórios como a melhoria da RS e a quantidade e qualidade dos embriões. No entanto, este procedimento exige equipamento especializado e operador com destreza suficiente para levar a cabo o procedimento (Bo et al., 1995; Kim et al., 2000).

A utilização de GnRH ou LH exógenos também tem sido usada para provocar ovulação do FD e consequente sincronização da emergência da onda folicular, contudo, está dependente das características do folículo na altura do tratamento (Bo, Guerrero & Adams, 2008).

Kohran et al. (1998), citados por Gordon (2003) referem a utilização de GnRH para suscitar a emergência de uma onda folicular sincronizada nas vacas em diferentes fases do ciclo éstrico, o que permite promover um FD que pode ser removido por punção 4 dias depois. Fêmeas bovinas imunizadas contra inibina revelam melhoria da RS, aumentando a quantidade e qualidade dos embriões transferíveis, quando comparadas com outras não tratadas (Bleach, Muttukrishna, Cunningham, Knight & Glencross, 1996; Li et al., 2009).

Várias manipulações experimentais visam anular este factor, incluindo: a administração de hCG (gonadotrofina coriónica humana) para que haja luteinização ou ovulação do FD (Rajamahendran & Calden); FSH em doses baixas (“priming”) antes do TS (Touati, Beckers & Ectors, 1991); fazer com que o início do tratamento coincida com a regressão do FD (Bó, Adams, Pierson & Mapletoft, 1995); pré-tratamento com vacinas anti-inibina (O’Shea et al., 1994); aspiração transvaginal do FD (Kim et al., 2000).

1.7 HORMONAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO SUPEROVULATÓRIO

1.7.1 Gonadotrofina coriónica equina (eCG)

A eCG é uma hormona glicoproteica produzida pelas células do trofoblasto de embriões equinos. Por este motivo a designação Pregnant Mare Serum Gonadotrophin (PMSG) foi o termo utilizado inicialmente (Gordon, 2002).

As células do trofoblasto invadem o endométrio entre os dias 36 e 40 de gestação. A eCG está presente no sangue das éguas entre os dias 40 e 130 de gestação, sendo a única entre as gonadotrofinas que possui as funções biológicas da FSH e LH (Gordon, 2002). Esta hormona tem revelado uma variabilidade na actividade relativa de FSH e LH, não só de égua para égua, mas também na mesma égua, em diferentes fases da gestação.

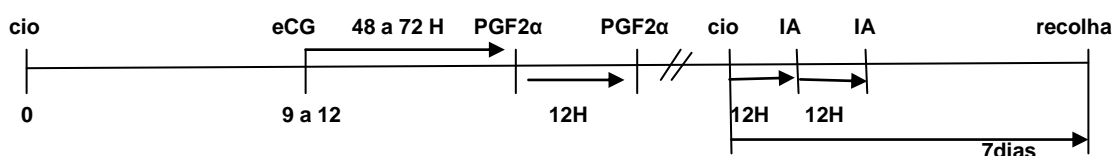
A eCG em comparação com a FSH ou com a menotropina (hMG) dá origem a ovários de maiores dimensões, a um elevado número de folículos anovulatórios e ao contínuo recrutamento de novos folículos (hiperestimulação) para além do tempo desejável, o que possivelmente, estará relacionado com o seu elevado tempo de semi-vida (cerca de 40 horas), consequência da elevada concentração em ácido siálico, que provoca uma alteração no perfil endócrino e um ambiente estrogénico no útero que, por sua vez, afecta a taxa de fertilização e o desenvolvimento embrionário. Para prevenir a hiperestimulação, anticorpos contra eCG (anti-eCG) podem ser aplicados na altura da inseminação (Boland, Goulding & Roche, 1991; Aerts & Bols, 2010).

Uma das indicações para o uso da eCG é a facilidade de execução do TS, com apenas uma única injeção intramuscular (2000 – 2500 UI de eCG) em animais em sistemas de produção extensiva ou agressivos (ver figura 2). Ao contrário, no tratamento com FSH são necessárias várias administrações, devido ao seu menor tempo de semi-vida.

Segue-se a dupla administração de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) ou análogo de síntese, 48-72 horas depois do início do TS, com 12 horas de intervalo (Aerts & Bols, 2010). Esta estratégia parece conduzir à obtenção de melhores resultados.

Espera-se que a dadora entre em cio dois dias depois (48 – 96 horas) ou seja, 4 dias depois do início do TS (Ball & Peter, 2004).

Figura 2: Esquema de TS padrão com utilização de eCG



1.7.2 Anti-eCG

A aplicação de anti-eCG tem como objectivo interromper a acção prolongada da eCG, prevenindo a excessiva estimulação dos ovários (a hiperestimulação é caracterizada pela presença de muitos folículos anovulatórios) e consequente permanência de níveis elevados de estradiol circulante (Boland et al., 1991).

O seu uso tem resultado em menor número de folículos de grandes dimensões na altura da recolha dos embriões, mas nem sempre essa redução tem sido acompanhada de aumento do número de embriões transferíveis (Boland et al., 1991; Fernandes, 2005).

Chagas e Silva, Lopes da Costa & Robalo Silva (2002) não constataram diferenças significativas nas RS do grupo de animais tratados com FSH-p em relação ao grupo de animais tratados com eCG + anti-eCG.

A escolha da melhor ocasião para a administração de anti-eCG permanece pouco clara.

A inibição da eCG antes do pico pré-ovulatório de LH já demonstrou alterar a função normal dos folículos estimulados (Vos, Bevers, Willemse & Dieleman, 1995). Saumande, Procureur & Chupin (1984), administraram anti-eCG 12h ou 24h após o início do estro a vacas superovuladas com eCG e obtiveram uma percentagem maior de embriões de boa qualidade relativamente ao grupo controlo. Contudo, os valores mostraram-se semelhantes quanto à taxa de ovulação e ao número de embriões recolhidos.

Segundo Callesen, Bak & Greve (1992), a aplicação de anti-eCG em tempo fixo relacionada com: a altura da aplicação de eCG, com a aplicação de PGF_{2α} ou com a altura do estro, não

produz resultados satisfatórios (não houve melhoria nem da quantidade, nem qualidade dos embriões transferíveis) atribuindo a causa à variação de tempo que pode ocorrer entre o pico de LH e outros eventos (altura da aplicação de eCG, da PGF_{2α} ou da altura da manifestação do estro). A normalização da função reprodutiva da dadora também não apresentou melhoria após a utilização de anti-eCG.

1.7.3 Hormona folículo estimulante (FSH)

A eCG foi utilizada durante muito tempo para superovular vacas. Contudo, e para tentar reduzir a variabilidade da resposta, aumentar a taxa de ovulação e melhorar a qualidade dos embriões, começou a ter incremento a utilização de extractos hipofisários (Galli et al., 2003). São muitas as evidências que reforçam a ideia de que uma melhor e mais consistente RS é conseguida através da utilização de FSH, em vez de eCG (Donaldson & Ward, 1987; Goulding, Williams, Roche & Boland, 1991).

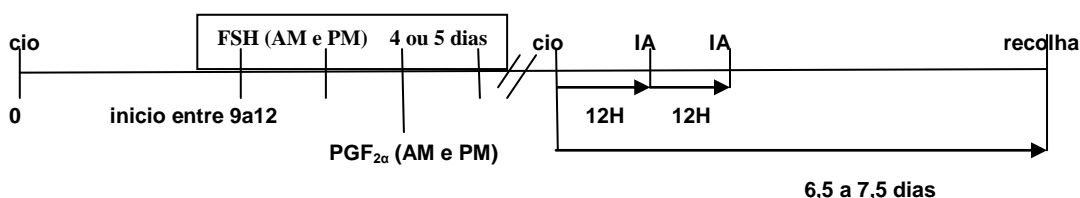
Devido ao seu reduzido tempo de semi-vida (inferior a 5 horas em vacas), os extractos hipofisários são administrados frequentemente, duas vezes ao dia, durante 3-4 dias consecutivos (ver figura 3). É aconselhável a aplicação de doses constantes ou decrescentes, dia após dia (Aerts & Ball, 2010).

Todas as preparações comerciais de FSH são extractos hipofisários de espécies pecuárias (suínos na maioria das preparações, ou ovinos) e apresentam quantidades variáveis de LH. A variação dos rácios FSH:LH tem sido apontada como uma das causas da variabilidade da RS (Donaldson & Ward, 1987).

Donaldson e Ward (1985) referem que quando utilizaram preparações menos contaminadas com LH, ou seja, mais purificadas, obtiveram embriões de melhor qualidade.

Sugere-se que o nível máximo aceitável de contaminação de LH nas preparações de extractos hipofisário deveria ser entre os 15-20% da dose de FSH (Gordon, 2002).

Figura 3: Esquema do TS padrão com utilização de FSH



1.7.4 Menotropina (hMG)

A menotropina ou gonadotrofina da menopausa humana, produzida na hipófise da mulher em menopausa, tem uma grande actividade tanto de FSH, como de LH, podendo deste modo ser utilizada como hormona superovulatória. A sua produção deve-se à ausência do

“feed-back” negativo por acção de estrogénios, como consequência da drástica diminuição de folículos maduros no ovário.

A sua utilização em programas comerciais é proibitiva devido ao seu custo, ao curto tempo de semi-vida e à obtenção de resultados menos favoráveis quando comparados com tratamentos com extractos hipofisários porcinos (FSH-p) (Alcivar, Maurer & Anderson, 1992; Hunter, 1980 citado por Azevedo,1993).

1.7.5 Extracto hipofisário de equino

Com o intuito de diminuir a variabilidade da RS com a utilização de FSH-p, foi testada a utilização de uma nova hormona. TS com extracto de hipófise de equino (HAP) foram realizados e avaliados. Os resultados foram melhores nos animais superovulados com FSH-p (a taxa de ovulação e número de embriões recolhidos foram superiores) quando comparados com animais tratados com HAP. Apesar de não se ter conseguido diminuir a variabilidade da RS utilizando HAP, em comparação com FSH-p, ficou demonstrado que a superovulação também é possível com HAP (Staigmiller et al., 1992).

1.8 OUTRAS ESTRATÉGIAS DE TS

1.8.1 Aplicação única de FSH

A aplicação única de FSH tem ganho credibilidade pelos resultados obtidos (mesmo não havendo diferenças significativas no que diz respeito ao número total de oócitos recolhidos e de embriões transferíveis, em comparação com o método padrão), utilizando-se como veículo gel de hidróxido de alumínio (Kimura et al., 2007) ou polivinilpirrolidona (Yamamoto, Ooe, Kawaguchi & Suzuki,1993). Na ausência destes veículos, Kelly et al. (1997) compararam as RS de animais tratados com uma administração única de gonadotrofinas com as de animais tratados com múltiplas administrações de gonadotrofinas. Independentemente da gonadotrofina utilizada (Pluset® ou Folltropin®), animais tratados com administrações múltiplas de gonadotrofinas apresentaram melhores resultados, registando maior número de embriões recolhidos.

1.8.2 Pré-estimulação ou “priming”

Esta técnica consiste na aplicação de doses baixas de FSH no início do ciclo éstrico com o objectivo de aumentar o número de folículos de pequenas dimensões que irão posteriormente ser recrutados durante o TS dando origem a um número maior de embriões por TS. Contudo, não há consenso entre os investigadores e, alguns estudos revelaram melhoria da RS com “priming” (Rajamahendran, Canseco, Denbow, Gwazdauskas & Vinson, 1987; Touati, Beckers & Ectors, 1991), enquanto que outros não (Gray et al., 1992) e outros

ainda, concluíram ser prejudicial (Grasso, Guilbault , Roy & Lussier, 1989; Guilbault, Lussier & Grasso, 1992).

1.9 FASE DO CICLO ÉSTRICO EM QUE É FEITO O TRATAMENTO SUPEROVULATÓRIO

1.9.1 Diestro

A altura do ciclo éstrico mais favorável para iniciar-se o TS, tanto em vacas como em novilhas, é o período entre o dia em que o FD da primeira onda folicular atinge o seu diâmetro máximo e inicia o processo de atresia e a emergência da segunda onda folicular (entre dia 9 e 13, em que o dia 0 é o dia do estro) (Nasser, Adams, Bo & Mapletoft, 1993; Bo et al., 2002; Guerra, Bó, Villareal, Albrecht & Brogliatti, 2007).

O exame ginecológico antes do início do TS deverá revelar um CL de boa qualidade e, preferivelmente, ausência de um FD.

Dadoras com ciclos de 21-23 dias têm normalmente 3 ondas de crescimento folicular devendo assim iniciar-se o TS por volta do dia 9, altura em que ocorre a emergência da segunda onda de crescimento folicular. No caso de dadoras com ciclos éstricos de 18-20 dias, o tratamento deverá ter início no dia 10 (considerando o dia 0, o dia do cio) (Adams, 1994).

1.9.2 Início do ciclo éstrico

De forma a não iniciar o TS em presença de FD, uma das hipóteses para além do tratamento padrão poderá ser o de calendarizar o TS para o início do ciclo éstrico. Nesta altura, seria de esperar a presença de numerosos folículos antrais de pequeno tamanho que viriam a ser recrutados aquando TS com FSH. No entanto, quando comparada com o tratamento padrão esta estratégia revelou RS inferiores (Roberts, Grizzle & Echterkamp, 1994).

1.9.3 Utilização de dispositivos de progesterona

Segundo Farin, Moore e Drost (2007), muitos técnicos que trabalham em TE utilizam dispositivos intravaginais impregnados de P4 exógena (CIDR), que actua como “CL” artificial, com o objectivo de sincronizar um grupo de dadoras para iniciarem o tratamento com FSH, em simultâneo, 10 dias após o cio (ver tabela 4). Outro dos objectivos é o de poder iniciar o TS em qualquer altura do ciclo éstrico, sendo fundamental que sejam animais cíclicos e sem anomalias reprodutivas. Outros autores (Sawyer, Broadbent & Dolman, 1995) defendem que iniciar o TS com utilização de dispositivos de P4 sem ter atenção à altura do cio ou do crescimento de nova onda folicular pode originar resultados variáveis. A

justificação para tal resulta do facto do dispositivo de P4, por si só, não ser suficiente para provocar a atresia do FD ou impedir o crescimento de nova onda folicular.

Lafri et al. (2002) colocaram CIDR em vacas dadoras ao 11º dia do ciclo éstrico (dia 0 = dia do cio) e iniciaram TS ao 13º dia, com medições frequentes da concentração sanguínea de LH, tanto nas fêmeas com CIDR como nas dadoras controlo que não receberam CIDR e, concluíram que os valores máximos de LH eram semelhantes nos dois grupos (16-24 ng/mL). No entanto, o intervalo entre o final do tratamento e o pico de LH foi menos variável nos animais tratados com CIDR, colocando-se a hipótese de poder melhorar a qualidade dos embriões, aquando de uma inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

Tabela 4: Calendarização do TS com utilização de CIDR (adaptado de Farin, Moore & Drost, 2007)

Dia do tratamento	Tratamento
0	inserção do CIDR®
2 PM	100 µg Cystorelin®
4 PM	60mg (3.0cc) Folltropin-V®
5 AM	60mg (3.0cc) Folltropin-V®
5 PM	60mg (3.0cc) Folltropin-V®
6 AM	50mg (2.5cc) Folltropin-V®
6 PM	50mg (2.5cc) Folltropin-V®
7 AM	40mg (2.0cc) Folltropin-V®
7 PM	40mg (2.0cc) Folltropin-V®, 35mg (7.0cc) Lutalyse®
8 AM	40mg (2.0cc) Folltropin-V®, 25mg (5.0cc) Lutalyse® e remoção do CIDR®
9 AM	estro e IA
9 PM	estro e IA
16	recolha, transferência e congelação dos embriões

1.9.4 Progesterona e estradiol

O tratamento com P4 associado a estrogénios, resulta na supressão/atresia do FD podendo iniciar-se o TS, 4 dias depois, altura do crescimento de nova onda folicular. Desta forma, há uma sincronização de estro e de ovulação após a aplicação da PGF_{2α}, independentemente da altura do início do TS, sendo os resultados obtidos semelhantes aos TS realizados a meio do ciclo éstrico (Bo et al., 1995; Bó, Barusseli, Pablo & Martins, 2006).

Guerra, Bó, Villareal, Albrecht e Brogliatti (2007) realizaram um ensaio semelhante, em dias diferentes do ciclo éstrico, utilizando para além do dispositivo intravaginal de P4 contendo estrogénios, uma administração intramuscular de 50mg de P4. Os autores concluíram que,

apesar de não serem significativas as diferenças, o grupo de animais que iniciou o tratamento de sincronização do crescimento folicular entre os dias 8 e 12 do ciclo éstrico, (dia 0= dia do cio), com posterior início do TS 4 dias depois, apresentou melhor RS bem como embriões de melhor qualidade, em comparação com outros grupos de dadoras que iniciaram o tratamento de sincronização de crescimento folicular, no início ou fim do ciclo éstrico, facto que contrasta com os resultados obtidos por Bo et al., (1995 e 2006).

1.10 PREVISIBILIDADE DA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA

1.10.1 Expressão de cio

De uma forma geral, as dadoras superovuladas entram em cio 36-48 horas após a primeira injeção de PGF_{2α}. Grandes variações deste intervalo, podem caracterizar o tipo da RS (Greve et al., 1995; Dalessandro, 1999). Quando a dadora inicia o cio, antes das 36 horas poderá ser indicador de uma excelente resposta, produzindo muitos oócitos, mas a maioria poderá vir a não ser fertilizada (Dalessandro, 1999). Se a dadora, revelar cio depois das 48 horas após a primeira injeção de PGF_{2α}, ou não apresentar cio, pode significar que a sua RS é fraca ou negativa (Walsh et al., 1993; Greve et al., 1995; Dalessandro, 1999).

1.10.2 Níveis séricos de P4

A medição plasmática de P4, dias após o cio superovulatório, tem demonstrado estar directamente relacionada com a qualidade da RS: número de embriões viáveis, oócitos fertilizados e não fertilizados recolhidos (Chagas e Silva, Lopes da Costa, Robalo Silva, 2002).

1.10.3 Níveis séricos de estrogénio e de LH

Valores elevados de estradiol (E2), 30 horas após a administração de PGF_{2α}, são característicos de animais que receberam TS e tiveram boa RS (Roberge et al., 1995). Nestas fêmeas, o número de folículos é maior, o que irá contribuir para um aumento significativo da concentração de E2, que pode levar à dessensibilização da hipófise no sentido da libertação de LH, o que por sua vez, pode ter efeitos adversos na maturação dos oócitos, na ovulação, fertilização e desenvolvimento dos embriões. Roberge et al. (1995) obtiveram resultados que permitiram correlacionar de forma positiva, os valores de E2 e a frequência do pulso de LH, com a qualidade da RS.

1.10.4 Hormona antimulleriana (AMH)

É uma hormona segregada pelas células da granulosa dos folículos e cuja concentração plasmática tem mostrado ser um bom indicador da presença de folículos pré-antrais (Monniaux et al., 2010). Surge em concentrações mais elevadas na presença de folículos pré-antrais e antrais, diminui à medida que cessa o crescimento folicular e é baixa na presença de folículos dominantes e pré-ovulatórios (Rico et al., 2009).

Em estudos recentes, a determinação da concentração plasmática da AMH, antes do TS, demonstrou que dadoras com concentrações elevadas de AMH tinham melhores respostas foliculares e ovulatórias ao TS, quando comparadas com dadoras com baixos níveis de AMH (Rico et al., 2009; Monniaux et al., 2010).

1.11 SINCRONIZAÇÃO ENTRE DADORA E RECEPTORA

1.11.1 Importância

Sinais bioquímicos precoces emitidos após a expressão génica do concepto são essenciais para evitar a luteólise do CL e assegurar a manutenção da gestação.

As secreções do concepto contribuem também para a tolerância imunológica entre a mãe e o feto, para a indução de uma variedade de alterações bioquímicas no endométrio que ajudam a manter a gestação. Por seu lado, o endométrio também produz uma variedade de substâncias, entre as quais, factores de crescimento e nutrientes, que suportam o desenvolvimento do concepto. Distúrbios na magnitude ou altura (assincronia) em que ocorre a produção dos sinais bioquímicos podem levar a que não se dê o “diálogo” apropriado entre o endométrio e concepto, comprometendo a sobrevivência do embrião (Ashworth, 1992): falha na implantação, mortalidade precoce, desenvolvimento e crescimento retardados ou crescimento e desenvolvimento acelerados (Thatcher et al., 1984; Plante, Bousquet, Guay & Goff, 1987; Barnes, 2000).

Tabela 5: Sincronia entre embrião e receptora e taxa de gestação (adaptado de Rorie et al., 2002)

Categoria da sincronização do estro (horas)	Número de embriões transferidos	Taxa de gestação (%)
-24	37	51,4 ± 8,2
-12	67	58,2 ± 6,1
0	9	66,7 ± 16,6
+12	68	61,5 ± 5,6
+24	37	48,6 ± 8,2

A assincronia pode ser negativa (quando o cio da receptora ocorre depois do cio da dadora) ou positiva (quando o cio da receptora ocorre antes do cio da dadora) (Hasler, 2001). Quando a assincronia ultrapassa as ± 24 horas, a TG das receptoras após transferência de embrião tem-se mostrado mais reduzida (ver tabela 5) (Rorie, Bilby & Lester, 2002; Stroud & Hasler, 2006).

1.11.2 Cio induzido vs cio natural

Quando comparadas as TG entre receptoras a quem foram induzidos os cios e as que fizeram cio natural com posterior transferência de embrião ao 7º dia, há divergência de opinião entre vários autores (Callesen, Liboriussen & Greve, 1996).

São vários os métodos de sincronização de cio das receptoras:

- detecção de cios espontâneos (efectivos numerosos com fêmeas cíclicas)
- dupla aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$;
- Sincronização de ovulações para TE em tempo fixo ("Ovsynch"+TE).
- combinação de progestagénios, estrogénios e $\text{PGF}_{2\alpha}$ (com ou sem eCG)

1.11.3 Cio natural

Em explorações de grandes efectivos, onde os cios ocorrem espontaneamente pode considerar-se que, por dia, cerca de 5% de fêmeas estão em condições de serem detectadas em cio.

1.11.4 $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou análogos de síntese

A indução de luteólise com $\text{PGF}_{2\alpha}$ com o intuito de encurtar a fase lútea, só é efectiva na presença de CL funcional que está presente entre os dias 7 a 17 de um ciclo éstrico normal (estro = dia 0). Quando aplicada a dose luteolítica nesta altura do ciclo éstrico, o intervalo de tempo entre a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ e o comportamento éstrico vai de 2 a 6 dias, variação esta que se deve às diferenças do desenvolvimento do FD na altura da administração e directamente, com a fase da onda folicular. Novilhas com FD viável entram em estro 48 a 60 horas após administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$, ao passo que as novilhas que têm o folículo em fase de atresia na altura da aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ só apresentam estro, 5 a 7 dias depois. Este facto, condiciona as taxas de gestação quando se pretende realizar TE em tempo fixo (Bó et al., 2002; Macmillan, 2010). A sincronia da luteólise não resulta em sincronia de estro e de ovulação. Daí que a detecção visual de cios é um componente fundamental da sincronização de estro com $\text{PGF}_{2\alpha}$. No entanto, o grau de sincronização da luteólise foi optimizado com a administração de uma segunda dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ 9 a 14 dias, após a primeira (ver tabela 6).

A colocação de dispositivos de P4 intravaginais, 5 dias antes da segunda administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumentou o número de animais em estro e a taxa de concepção, relativamente ao

protocolo de apenas duas injeções de PGF_{2α}, por evitar que, as fêmeas a quem não tenha sido provocada a luteólise após primeira administração de PGF_{2α}, manifestem cio antes da segunda administração de PGF_{2α} por regressão fisiológica do CL (Macmillan, 2010).

1.11.5 P4, E2 e PGF_{2α}, com ou sem eCG

A PGF_{2α} é frequentemente utilizada para a sincronização de cios das receptoras, no entanto, a sua capacidade de induzir luteólise e o cio é condicionada pela fase do ciclo éstrico, não tendo o efeito desejado nos primeiros e últimos dias do ciclo (d0-d5 e d17-d21). Dispositivos intravaginais de P4 têm tido sucesso, no que diz respeito a TG após TE, permitindo uma sincronização de cios de forma mais consistente (± 24 horas), relativamente à sincronização apenas com PGF_{2α} (Bó et al., 1995; Bó et al., 2002).

O tratamento com P4 (7 a 10 dias) e PGF_{2α} pouco antes ou no final do tratamento, tem demonstrado melhoria de fertilidade, não sendo porém, suficiente para a sincronização do estro/ovulação e posterior IATF. Para além disso, as TG são baixas nos casos de tratamentos com P4 sem E2 (cuja utilização é proibida na União Europeia), iniciados na fase lútea (Bó et al., 1995; Bó et al., 2002).

Baixa fertilidade está associada a tratamentos prolongados com P4 ou a tratamentos de curta duração iniciados no final do ciclo éstrico, implicando a manutenção do FD e ovulação de um oócito envelhecido. Este facto conduziu à necessidade de sincronizar o crescimento folicular para nos assegurar a presença de um FD viável, na altura da remoção da fonte de P4 e/ou da administração de PGF_{2α} (Bó et al., 1995; Bó et al., 2002).

A utilização de estradiol-17 β a par da P4 provoca atresia do FD, motivando o surgimento de nova onda de crescimento folicular, 4 dias depois (Bó et al., 1995; Bó et al., 2002)

A administração de eCG durante o tratamento de sincronização com P4 e estradiol, tem sido associada a um maior número de fêmeas aceites para receptoras de embrião (Bó et al., 2002), induz ovulações múltiplas com formação de vários CLs, sendo a concentração plasmática de P4 superior, em comparação com fêmeas não tratadas com eCG. Uma concentração de P4 plasmática mais elevada tem sido associada a uma melhoria do desenvolvimento do embrião, aumento da capacidade do concepto para segregar interferon- τ e TG mais elevadas (Nasser, Reis, Oliveira, Bó & Baruselli, 2004). Esta conclusão não é corroborada por ensaios realizados por outros investigadores em novilhas, que concluíram, que o aumento dos níveis de P4 não melhorava a TG nas receptoras (Chagas e Silva & Lopes da Costa, 2005), mas pelo contrário, diminuía à medida que os níveis de P4 ultrapassavam um certo patamar (Nogueira et al., 2004). Porém, no caso das receptoras vacas, a medição de P4 plasmática ao 7^o dia do ciclo éstrico revelou concentrações inferiores em comparação com as receptoras novilhas, o que poderia afectar

a sobrevivência embrionária nesse tipo de fêmeas (Chagas e Silva, Lopes da Costa & Robalo Silva, 2002).

1.11.6 GnRH e PGF_{2α}

As hormonas GnRH e PGF_{2α} são utilizadas no protocolo denominado “Ovsynch”, o mais utilizado nos Estados Unidos para a realização de IATF, programa que foi desenvolvido por Pursley e Wiltbank, no início da década de 90.

O protocolo consiste em 3 administrações hormonais. A primeira administração de GnRH deve causar ovulação ou luteinização se houver a presença de FD, nos ovários. Caso tenha ocorrido ovulação, há emergência de nova onda folicular 1,5 a 2 dias depois, que irá passar pelas fases de recrutamento, selecção e dominância e, 7 dias depois, surge novo FD. Nesta altura, aplica-se a PGF_{2α} que irá provocar lise do CL e permitir o crescimento e maturação do FD. Quarenta e oito horas depois, faz-se a segunda administração de GnRH que irá estimular a hipófise a produzir o pico pré-ovulatório de LH que, por sua vez, irá provocar a ovulação do FD, 28 horas mais tarde (Pursley & Bello, 2007). O sucesso do protocolo está intimamente relacionado com a altura do ciclo éstrico em que é iniciado (Vasconcelos, Silcox, Rosa, Pursley & Wiltbank, 1999). Se o tratamento tiver início nos dias 5-9 do ciclo a probabilidade das vacas ficarem sincronizadas e gestantes é maior. A razão para este facto deve-se à presença no início do tratamento de:

- FD que responde à GnRH durante a primeira onda folicular;
- CL que esteja funcional durante um período de 7 dias entre a GnRH e a PGF_{2α}.

Quando o tratamento tem início entre os dias 1 a 4, a sincronização fica comprometida pela presença de folículos pequenos que não são capazes de ovular aquando a aplicação da primeira dose de GnRH. Estes folículos em crescimento têm boas hipóteses de estarem em atresia antes da aplicação de PGF_{2α}. Outra das causas de não haver sincronização é a ocorrência de luteólise espontânea (final do ciclo) por produção de PGF_{2α} pelo endométrio, entre a primeira injeção de GnRH e a injeção de PGF_{2α} (Thatcher et al., 2001; Bó et al., 2002; Pursley & Bello, 2007).

1.11.7 Sucesso de “Ovsynch” em vacas e novilhas

Para além dos condicionalismos do programa “Ovsynch” acima referidos que podem conduzir ao insucesso da sincronização de ovulações, os estudos de Thatcher et al. (2001) e Bó et al. (2002) demonstraram que, para além disso, no caso de novilhas, o programa não é tão eficaz como para as vacas, porque nem sempre ocorre a ovulação do FD aquando injeção de GnRH, não havendo sincronização da emergência de nova onda de crescimento folicular.

1.11.8 “Ovsynch” + dispositivo de progesterona

Uma forma de evitar a lise do CL antes da injeção da $PGF_{2\alpha}$, com consequente exibição de cio e ovulação, é conseguida através da aplicação de um dispositivo de P4 desde a primeira administração de GnRH até à aplicação da $PGF_{2\alpha}$ (Bó et al., 2002; Bartolome et al., 2009; Yoshida, Yusuf & Nakao, 2009; Galvão & Santos, 2010).

Tabela 6: Calendário de ovulação múltipla na novilha dadora e de sincronização de cios das receptoras (Fonte: Chagas e Silva (2010)/ Programa OMTE juvenil da ilha Graciosa)

Data	Manhã	Tarde
dia 1	08h- 2mL Veteglan® (IM) às receptoras	
dia 3	08h- colocação de CIDR® às dadoras	
dia 10	08h- 4mL de Pluset®+1mL de soro fisiológico (IM) às dadoras	20h- 4mL de Pluset®+1mL de soro fisiológico (IM) às dadoras
dia 11	08h- 3mL de Pluset®+2mL de soro fisiológico (IM)	20h- 3mL de Pluset®+2mL de soro fisiológico (IM)
dia 12	08h- 2mL de Pluset®+3mL de soro fisiológico (IM) às dadoras. 2mL de Veteglan® (IM) às receptoras	20h- 2mL de Pluset®+3mL de soro fisiológico (IM) às dadoras.
dia 13	08h- remoção do CIDR® às dadoras+2mL de Veteglan® 1mL de Pluset®+4mL de soro fisiológico (IM) às dadoras	20h- 1mL de Pluset®+4mL de soro fisiológico (IM) às dadoras Início de detecção de cio às dadoras e receptoras
dia 14	Detecção de cios às dadoras e receptoras	1ª IA às dadoras (às 12horas após o início do cio superovulatório) Detecção de cios às dadoras e receptoras
dia 15	2ª IA às dadoras (12horas após a 1ª IA) Detecção de cios às receptoras	
dia 21	Recolha de embriões às dadoras; transferência em fresco para as receptoras seleccionadas e congelação dos excedentários	
dia 59	Diagnóstico de gestação às receptoras (45 dias de gestação)	

1.12 ESTRATÉGIAS DE BENEFICIAÇÃO DA DADORA

A beneficiação de dadoras pode ocorrer por cobertura ou IA.

1.12.1 Altura da IA

A oportunidade de IA da dadora é um dos factores mais importantes para a obtenção de bons resultados nas fêmeas superovuladas sujeitas a recolha. O indicador de maior confiança da melhor altura para inseminar a dadora é quando esta é observada com reflexo de imobilização (RI), deixando-se montar pela primeira vez.

Taxas de fertilização elevadas geralmente resultam de IA da dadora 12-14 horas depois do RI, seguida de uma outra IA, 17-24 horas depois do RI. Quando só é possível fazer-se uma IA, dado o preço do sémen e/ou pela disponibilidade do inseminador, é aconselhável realizá-la 16-20 horas depois do RI (Stroud & Hasler, 2006).

1.12.2 IA da dadora com protocolo de IATF

O recurso a hormonas como P4 e estradiol permitem a sincronização da onda folicular, o que torna possível o início do TS em qualquer altura do ciclo éstrico bem como IATF e, segundo alguns investigadores (Bó et al., 2006), não há compromisso nem da RS, nem da qualidade dos embriões. O estradiol actua provocando a atresia do FD, ao passo que a P4 bloqueia o eixo hipotálamo-hipófisário, criando as condições necessárias para que 4 dias depois se possa iniciar o TS na ausência de FD. A administração de GnRH (para estimular a hipófise a produzir e a libertar LH) ou hormona luteinizante porcina, na altura da remoção da fonte de P4, pode ser utilizada para diminuir a variação de tempo entre as ovulações (Bó et al., 2006).

1.12.3 Qualidade do sémen

Para além da oportunidade da IA, a qualidade do sémen tem uma relação directa muito significativa com a percentagem de oócitos fertilizados e de embriões transferíveis (ver tabela 7) (Stroud & Hasler, 2006).

Como o TS altera o transporte gamético e provoca “stress” no tracto reprodutivo, quantidades adequadas de sémen de boa qualidade são cruciais para a obtenção de boas taxas de fertilização (Hawk, 1988; Hyttel, Callesen, Greve & Schmidt, 1991; Mapletoft & Stookey, 1998).

Tabela 7: Relação entre qualidade do sémen utilizado em OMTE e a taxa de fertilização e a qualidade embrionária (adaptado de Stroud & Hasler, 2006)

Qualidade do sémen	% de oócitos fertilizados (n=9732)	% de embriões excelentes (n=4035)
Excelente	82,1	61,2
Boa	67,6	55,7
Fraca	58,3	53,9
Pobre	51,8	33,7

1.13 UTILIZAÇÃO DE SÉMEN SEXADO

1.13.1 Vantagens

A utilização de sémen sexado permite o aumento do número de nascimentos de um determinado sexo numa população fechada, incrementando desta forma a intensidade de selecção para aquele sexo (Nicholas, 1996).

A principal aplicação de sémen sexado, tem sido a sua utilização em novilhas de leite para a obtenção de crias fêmeas, garantindo assim o número de futuras produtoras (Schenk, Suh & Seidel, 2006).

Neste tipo de explorações, apenas interessa obter embriões do sexo feminino como resultado de programas de OMTE, constituindo os embriões do sexo oposto um custo adicional. Para além disso, é mais simples, prático e eficiente pré-seleccionar o sexo dos embriões utilizando sémen sexado num programa de OMTE, do que a sexagem do embrião após a biópsia e PCR (Polymerase Chain Reaction) (Schenk et al., 2006).

1.13.2 Desvantagens

Dada a lentidão do processo de sexagem dos espermatozóides, poucos são utilizados por dose seminal ($\approx 2 \times 10^6$) quando comparado com o sémen convencional ($\approx 20 \times 10^6$) e, por isso, as TG são quase sempre inferiores (Seidel, 1981; Garner & Seidel, 2008).

Os custos associados ao processo de sexagem dos espermatozóides, podem tornar inseminações múltiplas não viáveis.

Aliado ao facto de haver menos espermatozóides por dose seminal, os animais superovulados revelam um transporte gamético atípico ao longo do tracto reprodutivo, resultando em número reduzido de espermatozóides, no local de fertilização (taxa de fertilização em vacas superovuladas é cerca de 65%, aproximadamente 20% inferior às fêmeas com ovulações simples) (Schenk et al., 2006).

Hayakawa, Hirai, Takimoto, Ideta & Aoyagi (2009) utilizando sémen do mesmo touro, inseminaram as dadoras na mesma altura com o mesmo número de espermatozóides

sexados e não sexados. A taxa de embriões transferíveis obtida foi mais baixa e a taxa de oócitos não fertilizados mais alta, no caso das dadoras inseminadas com sémen sexado, relativamente às inseminadas com sémen não sexado. Estudo semelhante realizado por Balla et al., (2007) demonstrou da mesma forma que com ejaculados do mesmo touro e as dadoras inseminadas com sémen sexado tinham taxas de embriões transferíveis inferiores e taxas de oócitos não fertilizados superiores, quando em comparação com dadoras inseminadas com sémen não sexado.

Peippo et al. (2009) constataram que, em programas de OMTE, utilizando sémen convencional, a percentagem de oócitos não fertilizados era maior nas vacas (14,4%) do que nas novilhas (10,6%). Porém, esta diferença cresceu significativamente aquando da utilização de sémen sexado, 56,0% nas vacas e 21,1% nas novilhas.

A avaliação espermática de sémen sexado e convencional demonstra que o último é de melhor qualidade, revelando melhor motilidade e maior percentagem de células com membrana e acrossoma intactos (Carvalho, Sartori, Machado, Mourão & Dode, 2010).

No caso de fêmeas com ovulação simples, para além da taxa de gestação ser baixa quando é utilizado sémen sexado, por falha na fertilização dos oócitos, alguns estudos (Carvalho et al., 2010; Underwood, Bathgate, Ebsworth, Maxwell & Evans, 2010) apontam para o aumento da taxa de mortalidade embrionária aquando da utilização de sémen sexado.

Nas dadoras superovuladas, a taxa de mortalidade embrionária é também superior nas que foram inseminadas com sémen sexado, em comparação com as inseminadas com sémen convencional (53% vs 24%), situação que está relacionada com o processo de sexagem, que provoca danos na membrana plasmática e ADN dos espermatozóides, (Mocé, Graham & Shenk 2006).

São muitos os factores que podem influenciar o sucesso da utilização de sémen sexado em programas de OMTE: (a) qualidade, quantidade, pureza e potencial de fertilização do sémen; (b) resposta superovulatória; (c) percentagem de fertilização dos oócitos, recolha e viabilidade dos embriões; (d) altura do ano; (e) intervalo entre partos; (f) idade e paridade da dadora; (g) altura em que é efectuada e número de inseminações; (h) altura do ciclo éstrico em que começou o TS e dose de FSH; (i) local de deposição do sémen; (j) danos nos espermatozóides causados pelo processo de selecção - selecção feita a baixa pressão hidrostática (40 psi), melhora as taxas de fertilização quando comparado com selecção a pressão mais elevada (50 psi) (Schenk et al., 2006); (k) nutrição de dadoras e receptoras; (l) controlo de doenças; (m) detecção do estro; (n) manipulação correcta do sémen (Seidel, 2007; Dejarnette, Nebel & Marshall, 2009).

1.14 FACTORES QUE PODEM AFECTAR A RS

1.14.1 Desenvolvimento de folículos persistentes durante TS

Métodos de sincronização (mais frequentemente, P4 ou análogos de síntese) do cio são normalmente utilizados, juntamente com tratamentos com gonadotrofinas, para induzir o crescimento folicular, com o propósito de superestimular a dadora. No entanto, estes métodos de sincronização podem alterar a dinâmica ou crescimento folicular, levando ao desenvolvimento de um FD (especialmente se a aplicação do dispositivo de P4 ocorrer em presença de folículo de grandes dimensões) que pode persistir por longos períodos de tempo e, conseqüentemente, contrariar a RS (Wehrman et al., 1996).

Um número excessivo de folículos anovulatórios na presença de CL parece afectar negativamente a percentagem de embriões recolhidos devido à desfavorável relação E2:P4, que por sua vez, afecta o trânsito dos gâmetas e dos embriões, no tracto reprodutivo (Pursley & Bello, 2007).

1.14.2 Relação FSH:LH das preparações superovulatórias

Donaldson & Ward (1985) referem que os tratamentos com FSH purificada (ausência de LH) conduziram a uma RS melhor, com um maior número de embriões transferíveis. Resultados de ensaios posteriores não foram coincidentes, pois que, a LH tem um papel fundamental na fase final de maturação do folículo e no processo de ovulação.

Vários investigadores (Murphy, Reuben, Mapletoft, Manns & Humphrey, 1984; Herrler, Elsaesser, Parvizi & Niemann, 1991) estão de acordo que elevada contaminação de LH nas preparações folículo-estimulantes dão origem a más respostas ováricas, por ser prejudicial à foliculogénese, provocar ovulações prematuras, luteinização das células da granulosa e condicionar o pico pré-ovulatório de LH. Por outro lado, preparações puras ou com quantidades de LH muito reduzidas não são benéficas para a maximização da RS. É necessária quantidade mínima de LH nas preparações folículo-estimulantes para que ocorram ovulações múltiplas.

Preparações purificadas de FSH revelam ainda taxa de ovulação inferior às suplementadas com LH. Registou-se também que com este tipo de preparações ocorriam alterações no citoplasma dos oócitos e na maturação dos núcleos. Essas alterações podem dar origem a oócitos não fertilizados e à degeneração precoce dos embriões (Herrler et al., 1991).

1.14.3 Somatotropina (GH – growth hormone)

Tratamentos capazes de fazer elevar a concentração de IGF-I no fluido folicular dos ovários de vacas dadoras têm sido associados ao aumento do número de embriões viáveis produzidos *in vivo* (Herrler, Einspanier, Schams & Niemann 1994; Velazquez, Zaraza, Oropeza, Webb & Niemann, 2009).

A somatotropina é segregada pela hipófise. O seu efeito mais evidente incide no crescimento dos animais, induzindo o crescimento dos ossos longos dos animais jovens. A maioria dos seus efeitos são indirectos e são mediados pelo IGF-I que é produzido principalmente pelo fígado, mas também, por outros tecidos, como as células da granulosa dos folículos (que também possuem receptores para o IGF-I) quando estimulados por r-BST. No ovário, IGF-I é encontrado em concentrações elevadas no fluido folicular, principalmente do FD (Gordon, 2003).

Um dos factores responsáveis pela variabilidade da RS é a população de folículos sensíveis às gonadotrofinas, no início do TS. A aplicação de r-BST parece aumentar o número de folículos sensíveis às gonadotrofinas na altura do início do TS (Rieger, Walton, Goodwin & Johnson, 1991; Gong, Wilmut, Bramley & Webb, 1996; Webb & Armstrong, 1998; Lucy, 2000), bem como melhorar o desenvolvimento embrionário precoce *in vitro* (Pers-Kamezic, Warzych, Peippo & Lechniak, 2010), e *in vivo* (Cushman, DeSouza, Hedgpeth & Britt, 2001; Thatcher et al., 2001; Moreira, Badinga, Burnley & Thatcher, 2002).

1.14.3.1 Aplicação de r-BST antes do tratamento superovulatório

Gong et al. (1996) sincronizaram novilhas com PGF_{2α}, ao 7º dia do ciclo éstrico administraram 320 mg de r-BST (Somidobove®) e, 5 dias depois, iniciaram TS durante 4 dias com doses decrescentes de FSH. O grupo controlo recebeu 10 ml de soro fisiológico. Verificaram que o grupo de fêmeas que recebeu r-BST revelou mais ovulações, oócitos e embriões recolhidos e, mais embriões transferíveis. Herrler et al. (1994) já tinham obtido idênticos resultados com um ensaio semelhante.

1.14.3.2 Aplicação de r-BST na altura da inseminação da dadora

Thatcher et al. (2001) administraram r-BST (Posilac®, 500 mg) a fêmeas dadoras, no dia da inseminação e, em relação às fêmeas controlo, aquelas apresentaram menor número de oócitos não fertilizados, a percentagem de embriões dada como transferível foi maior (provavelmente devido à diminuição do número dos oócitos não fertilizados), o número de embriões recolhidos no estágio de blastocisto foi maior e a TG dos embriões que foram congelados em etilenoglicol, com posterior transferência directa, foi também superior ao grupo controlo.

1.14.3.3 r-BST nas receptoras

A aplicação de r-BST às receptoras de embriões aumentou a TG, em alguns estudos (Bilby et al., 1999; Moreira et al., 2002). Sugeriu-se como explicação uma melhoria do ambiente uterino para receber o embrião. No entanto, não é conhecido o mecanismo íntimo de acção. Em oposição, Hasler, Bilby, Collier, Denham & Lucy (2003) não obtiveram diferenças entre as TG de receptoras de embrião após a aplicação de r-BST, relativamente ao grupo controlo. Velazquez et al. (2005) não registaram igualmente qualquer relação entre IGF-I circulante das receptoras e a TG.

1.14.3.4 r-BST em tratamentos superovulatórios repetidos

A aplicação de r-BST tem demonstrado ser ineficaz na melhoria das RS a TS repetidos, no que diz respeito ao: número de CLs, embriões transferidos, embriões degenerados e oócitos não fertilizados (Hasler et al., 2003).

1.14.3.5 Desvantagem da aplicação de r-BST

Segundo Velazquez et al. (2009), poderá haver um limiar por determinar nas concentrações de IGF-I, a partir do qual, seria prejudicial para a embriogénese, aquando do TS. Este efeito negativo estaria associado a RS elevadas, que levaria a um aumento das concentrações de E2 e de IGF-I, no tracto reprodutivo. Estes poderiam afectar a viabilidade do embrião indirectamente, através da competência do oócito durante a fase folicular ou directamente, durante o período de pré-implantação.

1.14.4 Hormona luteinizante (LH)

A LH é libertada pela adeno-hipófise de forma pulsátil e com uma determinada frequência. A sua libertação e entrada na corrente sanguínea é estimulada pela GnRH através do eixo hipotálamo-hipofisário.

Fase lútea: as concentrações de P4 produzidas pelo CL estão elevadas e há bloqueio do eixo hipotálamo-hipofisário. A frequência dos pulsos de LH é menor e as concentrações de estradiol mais baixas quando em comparação, com o início e fim do ciclo éstrico (Cupp et al., 1995).

Fase folicular: as concentrações de P4 estão baixas e a amplitude dos pulsos de LH está aumentada devido ao aumento da concentração de E2, o que torna a hipófise mais sensível à GnRH e provoca o pico pré-ovulatório de LH, necessário à ovulação (Rathbone et al., 2001).

Superovulação: nos animais superovulados, a concentração de estradiol encontra-se a níveis supra-fisiológicos, devido à presença de múltiplos folículos pré-ovulatórios, causando a supressão da secreção de LH, que é essencial para manter o desenvolvimento dos folículos. Para além disso, o intervalo entre a aplicação da prostaglandina e o pico de LH é

mais curto nas fêmeas superovuladas que nas fêmeas com ciclo éstrico normal (Roberge et al., 1995; Soumano, Lussier & Price, 1998; Price, Carrière, Grosselin, Kohram & Guilbault, 1999). Daí que alguns estudos tenham tido como objectivo aumentar o período pré-ovulatório para melhorar o desenvolvimento e maturação dos folículos, bem como recolher embriões mais homogéneos e de melhor qualidade. Para tal feito, Van Leemput et al. (2000) utilizaram implantes de P4 e aplicação de GnRH aquando da remoção do dispositivo e, com isso, obtiveram, em relação ao grupo controlo, um pico pré-ovulatório de LH significativamente maior e uma maior taxa de ovulação. Outra forma de controlar o período de ovulação, poderá ser através da dessensibilização da hipófise, com deslorelina (agonista da GnRH), a estímulos endógenos ou exógenos, sendo a ovulação provocada pela injeção de LH exógeno (D'Occhio et al., 1997).

1.14.5 Tratamentos superovulatórios repetidos

Para alguns autores tem-se tornado claro que as dadoras não beneficiam em terem 2 ciclos éstricos entre os TS sucessivos como antes se julgava ser necessário. As dadoras são actualmente superovuladas repetidamente por períodos de 1 a 2 anos, a cada 40 dias ou menos, com resultados muito satisfatórios (Lubbadech, Graves & Spahr, 1980; Kafi, 1997; Hasler, 2004). Para outros, intervalos inferiores a 60 dias podem influenciar os resultados, (Chebel et al., 2008).

Quanto ao intervalo entre parto e início do TS, tem-se defendido que deverá ser no mínimo de 50 dias e a fêmea deverá estar cíclica e, a realizar um plano nutricional correcto (Mapletoft, 2006).

1.14.6 Factores ambientais e/ou de manejo

O desenvolvimento de um folículo desde a fase primordial até à fase pré-ovulatória, leva mais de 60 dias, período durante o qual, factores nutricionais e ambientais adversos, podem por em causa a qualidade dos oócitos e conseqüentemente do embrião, o que poderá conduzir a uma quebra da fertilidade (Webb & Armstrong, 1998; DeRensis & Scaramuzzi, 2003).

1.14.7 Nutrição

É sabido que a nutrição está directamente relacionada com a fertilidade, mas pouco se sabe sobre os efeitos do estado nutricional e a importância de cada nutriente em específico na RS, na qualidade dos oócitos e embriões, bem como nas gestações subsequentes à TE (Santos, Cerri & Sartori, 2008).

A alimentação pode influenciar a actividade ovárica, através do eixo hipotálamo-hipófiso-ovárico. Alterações no plano nutricional podem afectar o crescimento folicular, por indução

de alterações nos metabolitos do plasma e de hormonas, como a insulina e o IGF-I (Gong et al., 2002; Freret et al., 2006).

Segundo alguns autores, a sobrealimentação energética e proteica em vacas é prejudicial e deve ser evitada. Excesso de energia pode causar hiperinsulinémia e aumento de glucose e do IGF-I, que podem interferir com o transporte da glucose nos embriões e aumentar a apoptose. Excesso de proteínas e elevação de ureia e de amónia, nos fluidos corporais, podem ser tóxicos para os embriões (provavelmente por alterar o pH uterino e a função das células da granulosa), prejudicando o seu desenvolvimento (Freret et al., 2006; Santos et al., 2008).

No entanto, é necessário ter em atenção que fêmeas diferentes podem ter necessidades nutritivas diferentes. Por exemplo, vacas em pós-parto, altas produtoras, devido ao seu défice energético e/ou nutritivo, comprometem a qualidade dos oócitos, a fertilização e o desenvolvimento embrionário (Gordon, 1995; Santos et al., 2008).

Freret et al. (2006) recomendam uma restrição alimentar a curto prazo (pelo menos 6 semanas) antes do início de um programa de produção de embriões *in vitro* ou *in vivo*, quando as novilhas são sobrealimentadas (e têm um elevado ganho médio diário ou uma condição corporal elevada).

Gong et al. (2002) concluíram que novilhas dadoras a quem aumentaram a ingestão diária (200%), melhoravam o recrutamento dos folículos ovários e o seu número era maior no início do TS (efeito semelhante à utilização r-BST), melhorando a RS, em termos do número de folículos pré-ovulatórios e número de ovulações, em comparação com o grupo controlo (ingestão de 100%).

Lambe et al. (2008) compararam as RS de novilhas da raça Aberdeen Angus que receberam suplementos minerais orgânicos (grupo1) e inorgânicos (grupo2) durante 23 dias sem, no entanto, terem registado diferenças no que diz respeito à quantidade e qualidade dos embriões entre estes grupos e o grupo que não recebeu qualquer tipo de suplemento. Porém, mais estudos necessitam de ser realizados para um melhor conhecimento sobre a matéria.

Chorfi, Lanevski, Dupras, Ginard & Tremblay (2007) realizando medições sanguíneas às dadoras na altura da recolha, constataram que os níveis elevados de magnésio e potássio (elemento essencial nos meios de cultura de produção de embriões) e baixos de creatininoquinase, estão associados a um maior número de embriões transferidos.

1.14.8 Clima

O “stress” causado pelo calor ambiental tem forte impacto na reprodução dos bovinos, principalmente em vacas altas produtoras que têm a agravante da produção de calor metabólico, consequência da síntese do leite, que aumenta à medida que aumenta a produção de leite (Cole & Hansen, 1993).

A produção de embriões em programas superovulatórios é muitas vezes prejudicada pelo stress hipertérmico. Baixas RS, taxas de fertilização medíocres, má qualidade dos oócitos e embriões e reduzido número de embriões transferidos é um panorama frequente (Putney, Drost, Thatcher, 1988; Bényei, Gáspárdy & Barros, 2001; Hansen et al., 2001).

1.15 RECOLHA DOS EMBRIÕES

Nos primeiros programas de OMTE, os embriões eram recolhidos e transferidos por via cirúrgica, 4 dias após o cio superovulatório (Mapletoft, 2006). Frequentemente resultavam em decréscimo da capacidade reprodutiva de ambas, dadoras e receptoras, porque havia a formação de aderências no tracto genital. As TG variavam entre 50-60% (IETS, 1990).

As técnicas não-cirúrgicas são preferíveis por não provocarem danos no tracto reprodutivo. Podem ser repetidas no mesmo animal e serem efectuadas na exploração. Para além disso, quando realizadas por técnicos especializados não há diferenças significativas nas taxas de gestação (Hasler, 2001).

A recolha faz-se geralmente no dia 7 após o cio superovulatório, o que possibilita um estágio de desenvolvimento do embrião adequado à congelação, se tal for necessário. Antes do dia 6, os embriões ainda se podem localizar nos oviductos e a partir do dia 8,5, a ZP, que circunda a massa celular embrionária, ruptura, deixando o embrião demasiado frágil para ser congelado e sujeito a um maior risco de contaminação. As taxas de gestação com embriões frescos, recolhidos e transferidos entre os dias 6 e 8 depois do cio, não diferem. No entanto, para congelar os embriões de forma eficiente, as recolhas devem ser realizadas ao 7º dia (ver figura 6) (Curtis, 1991; Hackett, Durnford, Mapletoft & Marcus, 1993).

A aplicação prática das técnicas não-cirúrgicas de recolha e transferência de embriões requer métodos simples e atraumáticos. O material utilizado deve ser de “confiança”, barato e fácil de esterilizar ou, descartável. O operador deve possuir treino adequado e estar familiarizado com o aparelho genital da fêmea bovina, caso contrário a técnica não terá sucesso (Greve, 1977).

1.15.1 Preparação para a recolha

A dadora deve receber anestesia epidural baixa, cerca 1mL de lídocaína a 2%/100Kg peso vivo, e os membros anteriores devem ser colocados a uma altura de cerca de 0,3 metros

mais elevados em relação aos membros posteriores, para que os órgãos abdominais retenham o tracto genital dentro da cavidade pélvica, facilitando a drenagem do meio e a manipulação do útero por parte do operador (Hay, Phelps, Hanks & Foote, 1990).

A região vulvar, períneo e cauda devem ser devidamente lavadas. Esta última deve ser atada de forma a desimpedir o acesso à vulva (Greve, 1977).

Frequentemente utilizam-se cateteres de Foley que possuem um balão com cerca de 30 mL que deve ser testado quanto à sua integridade.

A instilação de um pouco de meio no interior da cateter de Foley antes da colocação do mandril, facilitará a sua remoção após se ter transposto o cérvix e o cateter estar fixado (Curtis, 1991; Dallesandro, 1999).

Os cateteres de Foley podem ser de duas vias, como o cateter de Rush, em que numa via há entrada e saída do meio e na outra há passagem do ar. Este último possui uma terminação Luer-Lock para ligação directa da seringa. Há igualmente cateteres de três vias: para entrada de líquido, para a saída do líquido e uma última, para a passagem do ar.

1.15.2 Procedimento de recolha não-cirúrgica

O operador deve passar o cateter pelas pregas do cérvix e progredir sem causar traumatismo até que a sua extremidade, onde se encontra o balão, ficar localizada no terço anterior do corno uterino a ser lavado, cranialmente à bifurcação externa, (cerca de 2 a 4 cm, para além da bifurcação), repetindo-se o procedimento para o corno oposto (Curtis, 1991; Dallesandro, 1999).

Sartori et al., (2003) comparam lavagens profundas do corno uterino com lavagens de todo o corno uterino e concluíram que, no último caso, a percentagem de embriões/oócitos recolhidos relativamente ao número de embriões era maior e, a taxa de recolha de embriões variou entre os 20-25% e os 60-80%, respectivamente.

Quando o cateter se encontra no local pretendido, o balão deverá ser insuflado de forma a fixar o cateter às paredes do útero (Dallesandro, 1999), mas com cuidado para não provocar a ruptura do endométrio e consequente perda do meio e de embriões (Mapletoft, 2006).

Após a fixação do cateter de Foley, retira-se o mandril e faz-se conexão a um tubo que está ligado na extremidade oposta ao frasco com meio de recolha, que deve estar a 1 metro acima do nível do útero. A outra via do cateter de Foley deverá ser ligada através de outro tubo a um frasco colector que estará ao nível do chão (ver figura 7).

A entrada de meio de recolha no corno uterino é feita por gravidade até este ficar túrgido (a avaliação é feita por palpação rectal), com cerca de 50 a 100mL, conforme o tamanho do aparelho reprodutor da dadora. O útero é esvaziado como o auxílio de massagem rectal para o frasco colector e o procedimento é repetido até ao final da recolha (Hay et al., 1989). Cada corno uterino deve ser sujeito a 6 ou 7 lavagens. As entradas e saídas do meio são

controladas por pinças, uma em cada via que não devem ser abertas em simultâneo durante a lavagem (Betteridge, 1977).

No processo de lavagem dos cornos uterinos é necessário ter em conta alguns pormenores:

- o meio de recolha deve alcançar a ponta do corno uterino visto que provavelmente é aí que se localizam a maioria dos embriões, uma semana depois do estro;
- deve ser levado a cabo com o mínimo de stress e trauma para a dadora;
- o sucesso da lavagem está directamente relacionado com o sucesso da recolha do meio, que deverá ser de 90 a 100% do volume introduzido (Gordon, 2002).

Figura 4: Recolha de embriões com sistema fechado ou por gravidade (original do autor)



1.15.3 Variações nas metodologias de recolha

A realização de uma segunda recolha, 24 horas depois da primeira, demonstrou aumentar a taxa de recolha de embriões em 30%. No entanto, trata-se de um processo demasiado exigente em termos económicos para os programas comerciais. Em alternativa, após a primeira recolha, não é retirado o cateter de Foley e são instilados no útero, 80-150 ml de PBS, e é obliterada a saída do catéter. Trinta minutos depois, recolhe-se o PBS (segunda lavagem). Esta estratégia pode melhorar a taxa de recolha dos embriões (Castro Neto et al., 2005).

Diferentes são as opiniões quanto à recolha de embriões por lavagem de um corno uterino de cada vez ou por lavagem do corpo e os dois cornos uterinos em simultâneo. No primeiro caso, o procedimento já foi anteriormente descrito, ao passo que na lavagem em simultâneo de corpo do útero e ambos os cornos uterinos, o balão do catéter deve ser insuflado imediatamente após o cérvix. Aparentemente a eficácia da recolha parece ser semelhante em ambas as abordagens (Dallesandro, 1999; Hasler, 2004) ou inferior, quando se faz a lavagem dos dois cornos uterinos em simultâneo (Hay, Phelps, Hanks & Foote, 1990).

1.15.4 Meio de recolha

A maioria dos técnicos de TE utilizam uma grande quantidade de meio de recolha (1 a 2 litros) que é introduzido no útero por gravidade. Porém, outros utilizam apenas 0,5L por corno uterino (Hasler, 2004).

O meio de recolha é uma salina de tampão fosfato, frequentemente denominado por PBS (“phosphate-buffered saline”) contendo 1 a 2% de soro fetal bovino (FCS) inativado pelo calor ou albumina sérica bovina (BSA), antibióticos (normalmente 100 IU de penicilina, 100µg de estreptomicina e 25µg de anfotericina B por mL) (Thompson, 1996; Mapletoft, 2006).

1.15.5 Meio de manutenção

Quanto ao meio de manutenção é semelhante ao de recolha, com a diferença de ser mais rico em fonte proteica, contendo cerca de 10% de FCS ou BSA e possuir glucose e piruvato, como fonte de energia. Hoje em dia, o meio de recolha e de manutenção estão disponíveis comercialmente (Hasler, 2001; Nelson & Nelson, 2001; Mapletoft, 2006).

No início dos anos 70, o meio de cultura utilizado era o “bicarbonate buffered medium” (Ham’s F-10 e TCM-199) e os embriões eram incubados com CO₂ (dióxido de carbono). Posteriormente, este meio foi abandonado, pois não era prático em condições de campo (Nelson & Nelson, 2001).

1.16 MANIPULAÇÃO DOS EMBRIÕES EM LABORATÓRIO

Já em laboratório, após a recolha, o conteúdo do frasco colector é vertido para um filtro descartável (EM-COM) que possui uma malha com poros de 50 – 70µm de diâmetro, que deverá estar suspenso num suporte. Na ausência do filtro, pode deixar-se o frasco colector em repouso para que ocorra sedimentação dos embriões (Chagas e Silva, 1991). Pelo menos duas placas de Petri de fundo quadriculado devem estar numa mesa térmica a 25-30°C. Nelas é vertido o conteúdo do filtro de EM-COM (ver figura 5). Este dispositivo é lavado, com PBS, sobre as placas, de forma a transferir-se o conteúdo para as mesmas. Os

embriões são observados à lupa estereoscópica de base diascópica, a uma ampliação de 7,5-10X (Anne, Trouson, Aarts & McPhee, 1980; Curtis, 1991).

Figura 5: Transferência do meio contendo os embriões do filtro EM-COM para placas de Petri (original do autor)



1.16.1 Avaliação dos embriões

A classificação dos embriões é feita a uma ampliação de 50 a 100X (Hasler, 2001; Mapletoft, 2006) e é uma avaliação subjectiva, dependendo da experiência do operador e baseada nas características morfológicas do embrião, de acordo com as indicações do Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) (ver anexos).

1.16.2 Classificação dos embriões quanto ao estágio de desenvolvimento

Estádio 1- não fertilizado ou embrião de apenas uma célula;

Estádio 2- embrião com 2 a 12 células;

Estádio 3- Jovem mórula;

Estádio 4- Mórula compacta;

Estádio 5- Jovem blastocisto;

Estádio 6- Blastocisto;

Estádio 7- Blastocisto expandido;

Estádio 8- Blastocisto eclodido;

Estádio 9- Blastocisto eclodido em expansão.

Fonte: IETS, 1990

O diâmetro total do embrião é de 150 a 190 µm e mantêm-se inalterado desde o estágio de 1 célula até ao estágio de blastocisto. O melhor indicador de viabilidade do embrião é este estar no estágio de desenvolvimento que seria de se esperar, na altura da recolha (Mapletoft, 2006).

1.16.3 Classificação dos embriões quanto à qualidade

Qualidade 1: Excelente ou Bom - massa embrionária simétrica e esférica com blastómeros (células) individuais uniformes em tamanho, cor e densidade. Este embrião é consistente com o estágio de desenvolvimento esperado.

As irregularidades devem ser relativamente pequenas, pelo menos 85% do material celular deve estar intacto e ser viável. Este julgamento deve ser baseado na percentagem de células embrionárias eliminadas para o espaço perivitelino. A ZP deve ser esférica e lisa e não côncava ou achatada, o que pode provocar aderência do embrião à placa de Petri ou à palhinha.

Qualidade 2: Razoável - irregularidades moderadas em toda a massa embrionária ou no tamanho, cor ou densidade das células individuais. Pelo menos 50% do material celular deve corresponder a massa embrionária intacta e viável.

Qualidade 3: Medíocre - maiores irregularidades na forma da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Pelo menos 25% do material celular deve ser constituído por massa embrionária intacta e viável.

Qualidade 4: Morto ou degenerado - embriões degenerados, oócitos ou embriões retardados: não transferíveis.

Fonte: IETS, 1998

A qualidade dos embriões está directamente relacionada com a TG. Porém, há embriões de qualidade 1 que não mantêm uma gestação, ao passo que embriões de qualidade inferior podem fazê-lo. Este facto demonstra que o sucesso de um programa de OMTE não passa exclusivamente pela qualidade do embrião, mas também por outros factores igualmente importantes como por exemplo, o maneo e a qualidade da receptora (Shea, 1981).

Ao comparar-se vacas e novilhas de aptidão leiteira superovuladas, verificou-se que a taxa de embriões de qualidade 1 das vacas em lactação é significativamente menor do que nas novilhas e a sua coloração mais escura, possivelmente por acumulação lipídica, o que poderá explicar em parte, os problemas de infertilidade das fêmeas em produção (Leroy et al., 2005).

Figura 6: Mórula/jovem blastocisto e blastocisto são os estádios de desenvolvimento esperados em embriões com 7 dias (original do autor)



Mórula/Jovem Blastocisto

Blastocisto

1.17 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

Todas as novilhas com cio detectado e registo de reflexo de imobilização são sujeitas a um exame ginecológico prévio para a identificação, localização e avaliação do CL, que se espera que tenha desenvolvimento adequado relativamente ao dia da TE (dia 7 do ciclo éstrico) (Hasler, 2001; Chagas e Silva, 2009). Caso seja seleccionada, a receptora é sujeita a uma anestesia epidural baixa, de forma a bloquear o peristaltismo do recto e esfíncter anal, com o objectivo facilitar a técnica de TE e evitar a conspurcação com fezes.

O embrião a ser transferido é posteriormente aspirado para uma palhinha de 0,25 mL juntamente com meio formando uma coluna que se separa de outras colunas por câmaras de ar. A palhinha é então colocada no “pistolet” de TE de Cassou (IMV, França), por sua vez protegido por uma bainha plástica TE e camisa sanitária. O “pistolet” deve passar gentilmente através do cérvix e progredir o máximo possível ao longo do corno uterino, até atingir a sua extremidade distal, do mesmo lado do ovário que contém o CL, sem provocar lesão (ver figura 7). Caso haja lesão do endométrio durante a progressão do cateter ao longo do corno uterino com consequente hemorragia, o embrião provavelmente não sobreviverá (Greve, 1980; Curtis, Elsdén & Seidel, 1981). A experiência do operador é determinante para a obtenção de bons resultados (Curtis et al., 1981; Thompson et al. 1982). Factores como a localização da colocação do embrião no corno uterino ipsilateral ao ovário contendo o CL, a qualidade do embrião, lesão do endométrio, tempo dispendido na execução da técnica de transferência ou estatuto sanitário da receptora influenciam significativamente os resultados (Shea, 1981; Thompson et al., 1982; Sreenan, 1988).

Figura 7: Transferência não-cirúrgica de embrião (original do autor)



2 CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS

2.1 INTRODUÇÃO

O objectivo da congelação de embriões é a preservação do metabolismo celular em estado de quiescência, para que o mesmo possa ser restabelecido e, após descongelação e TE, o embrião possa retomar o seu desenvolvimento normal. Isso é conseguido por meio do armazenamento a baixas temperaturas, que induz a interrupção da actividade enzimática, do metabolismo e da respiração celular, possibilitando a conservação de células por tempo indeterminado (Gordon, 1994) (ver tabela 8).

O desenvolvimento de tecnologias de criopreservação de embriões veio revolucionar a bovinicultura. Na década de 70, quando a transferência comercial de embriões teve seu início, a sincronização dos estros já era utilizada. Porém nem sempre havia receptoras em número suficiente para as transferências. Consequentemente, descartavam-se os embriões excedentários ou eram incubados à temperatura ambiente ou a 0°C, até um máximo de 24 horas, para posterior transferência (Hasler, Hurtgen, Jin & Stokes, 1997).

A criopreservação permite, deste modo, a preservação dos embriões quando o seu número excede o número de receptoras disponíveis (Makarevich et al., 2010). Para além disso, proporciona o transporte genético global, permite a preservação de germoplasma durante longos períodos de tempo e, aumento da pressão de selecção genética no efectivo, a criação de uma linha de regeneração e proliferação de animais e ainda, pode ser utilizada para resgate de recursos genéticos (por desvio da selecção genética, doenças infecciosas, catástrofes naturais, etc.) (Dobrinsky, 2002; Makarevich et al., 2010). No entanto, as TG obtidas com embriões congelados são inferiores às dos embriões frescos (Dobrinsky, 1996; Hasler et al., 1997).

Tabela 8: Primeiro nascimento após transferência de embriões congelados (adaptado de Massip, 1999)

ESPÉCIES	ANO	REFERÊNCIA
Rato	1972	Whittingham et al.
Vaca	1973	Wilmut and Rowson
Coelho	1974	Bank and Maurer
Ovelha	1974	Willadsen et al.
Rato	1975	Whittingham
Cabra	1976	Bilton and Moore
Cavalo	1982	Yamamoto et al.
Homem	1983	Trounson and Moor
Hamster	1985	Ridha and Dukelow
Gato	1988	Dresser et al.
Porco	1989	Hayashi et al.
Macaco rhesus	1989	Wolf et al.

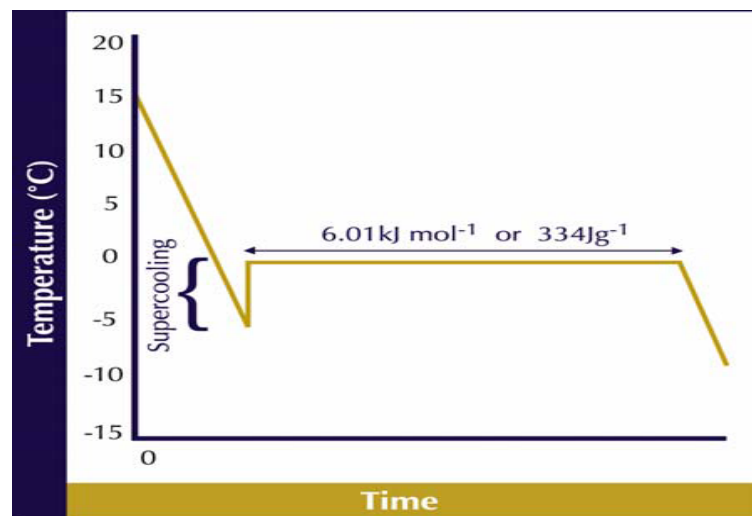
2.1.1 Princípios criobiológicos

Os embriões são constituídos por mais de 80% de água. O princípio fundamental da criopreservação baseia-se na necessidade de remoção máxima de água do interior da célula antes da congelação, para que não ocorra a formação de cristais de gelo e danos celulares irreversíveis como a ruptura das membranas e a morte celular, possibilitando o retorno do metabolismo celular, após armazenamento do embrião a baixas temperaturas (Seidel, 1986; Vajta & Kuwayama, 2006).

Todos os protocolos têm sido pensados de forma a proteger os oócitos/embriões contra a formação de cristais de gelo durante a congelação e reaquecimento. Se os embriões forem congelados em soluções fisiológicas, a formação de cristais de gelo intracelular e/ou compressões por formação de cristais de gelo extracelular iriam provocar lesões irreversíveis ao embrião. Para sua prevenção, é essencial a inclusão de crioprotectores na solução. A água presente no interior das células é substituída por crioprotectores e os embriões são desidratados à medida que a temperatura vai baixando (ver figura 9). Para tal, são utilizadas taxas de arrefecimento controladas e crioprotectores (que variam quanto ao tipo e concentração) e, mesmo assim, as lesões por formação de cristais de gelo são as mais frequentes (Palasz & Mapletoft, 1996; Leibo, 2008). Após ser alcançada suficiente desidratação, o embrião e a fracção de solvente extracelular não congelada, irão ser vitrificados após serem mergulhados em azoto líquido (Saragusty & Arav, 2011).

Segundo Karow (2001), o processo de congelação ocorre da seguinte maneira: quando a 0°C à pressão atmosférica normal, a água pura encontra-se parcialmente congelada, sendo este o seu ponto de equilíbrio de congelação, em que cristais de gelo e água coexistem em equilíbrio e de forma homogénea. Uma vez iniciada a formação de cristais, ocorre libertação de energia sob a forma de calor (calor latente de fusão) (ver figura 8), o que aumenta a temperatura necessária para atingir o ponto de equilíbrio de congelação (0°C), e quase toda a água líquida é convertida em gelo, continuando de seguida a descida de temperatura.

Figura 8: Representação das variações de temperatura ao longo do tempo, na congelação da água pura, dando ênfase ao calor de fusão (adaptado de Karow, 2001)



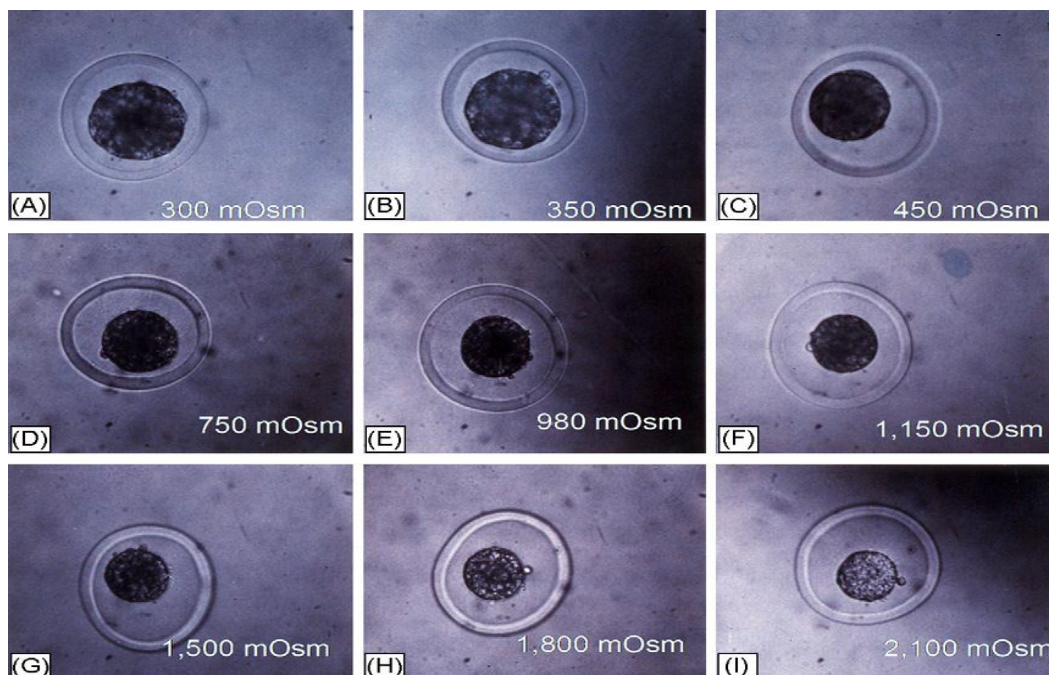
A adição de crioprotectores ao meio faz com que a temperatura de congelação se torne mais baixa, retardando o aparecimento dos cristais e diminuindo a temperatura em que se dá o equilíbrio de congelação, para uma temperatura inferior a 0°C .

Tendo em conta que materiais biológicos possuem diversos solutos e sais intra e extracelulares, o ponto de fusão é menor do que o da água pura, e, à medida que está a haver congelação do solvente, há aumento da concentração dos solutos na porção líquida remanescente, alterando a osmolaridade intra e extracelular. Desta forma, quando a taxa de arrefecimento é baixa, a água tem mais tempo para sair das células por osmose, antes que se dê a formação de cristais de gelo (Seidel & Elsdén, 1989). Porém, taxas de arrefecimento demasiado baixas expõem as células embrionárias a condições não fisiológicas e desfavoráveis, como elevada concentração de crioprotector (o que pode provocar o chamado “efeito de solução”) e grande alteração do volume celular (“encolhimento”) (Woelders & Chaveiro, 2004).

A perda de água pela célula quando exposta a soluções hipertónicas depende de uma característica fundamental, que é a sua permeabilidade à água. Esta característica é determinada pela composição da membrana celular, pela temperatura, área da superfície do embrião e pela diferença de pressão de vapor intracelular e extracelular (o equivalente entre diferença de pressão osmótica entre o meio intracelular e extracelular) (Leibo, 2008). A permeabilidade ao crioprotector depende das características do mesmo e dos mesmos factores referidos para a permeabilidade à água (Niemann, 1991).

Na mesma espécie, diferentes estádios de desenvolvimento embrionário, desde oócito a zigoto, e mesmo vários estádios de clivagem, variam na sua permeabilidade para o mesmo crioprotector (Niemann, 1991; Leibo, Martino, Kobayashi & Pollard, 1996; Leibo, 2008). Para espécies diferentes, oócitos ou embriões no mesmo estádio de desenvolvimento, apresentam permeabilidade diferente para o mesmo crioprotector (Leibo, 2008).

Figura 9: Mórula a encolher-se quando apresentada a soluções com concentrações crescentes (adaptado de Leibo, 2008)



A sensibilidade dos embriões às temperaturas de arrefecimento é variável e depende da espécie (isto é, embriões de suínos são mais sensíveis ao arrefecimento do que os embriões de bovinos), modo de produção (*in vivo* ou *in vitro*), conteúdo lipídico, tamanho, estádio de desenvolvimento, qualidade dos oócitos/embriões e, características dos crioprotectores (concentração, permeabilidade, propriedades osmóticas e toxicidade) (Palasz & Mapletoft, 1996; Leibo, 2008).

Tal como já foi referido, os crioprotectores são fundamentais para prevenção de danos celulares durante a congelação e aquecimento. Estão divididos em 3 grandes grupos: permeáveis de baixo peso molecular (metanol, etilenoglicol (PM=62,1), propanodiol, dimetilsulfóxido (DMSO) (PM=78,2), butanediol, glicerol (PM=92,1), outros álcoois); não permeáveis de baixo peso molecular (galactose, glucose, sacarose e outros açúcares); e não permeáveis de alto peso molecular (polivinilpirrolidona e outros polímeros).

Os crioprotectores permeáveis de baixo peso molecular, por osmose, substituem a água intracelular das células dos embriões antes da congelação e, com taxas de arrefecimento lentas e controladas, reduzem as variações de volume das células e minimizam a formação de cristais de gelo.

A junção de crioprotectores não permeáveis de baixo peso molecular, associado a crioprotectores permeáveis, aumenta a concentração dos últimos no interior das células e a desidratação das mesmas, o que reduz a formação de cristais de gelo. Para além disso, diminui a toxicidade do crioprotector permeável, por permitir reduzir a sua concentração.

Os crioprotectores não permeáveis de alto peso molecular, protegem as células durante a congelação e reaquecimento, alterando a formação dos cristais de gelo, para um tamanho e forma inócuos (Palasz & Mapletoft, 1996).

Apesar da utilização indispensável de crioprotectores permeáveis no processo de congelação, a sua toxicidade é outro factor que necessita ser contornado para que não haja decréscimo significativo da viabilidade dos embriões. Este grupo de crioprotectores possui mecanismo de acção semelhante. Porém, a sua toxicidade varia conforme o crioprotector, sendo menos tóxica no caso do etilenoglicol e glicerol. Para a congelação lenta, a sua concentração limite é 1-2M e a toxicidade é relativamente baixa. No caso da vitrificação, as concentrações têm de ser superiores, podendo chegar aos 8M e, neste caso, a selecção de um crioprotector pouco tóxico torna-se mais importante (Visintin et al., 2002; Vajta, 2006).

A utilização de proteínas anticongelantes “anti-freeze protein” (AFP) ou da “anti-freeze glycoprotein” (AFG), tem sido sujeita a intensa investigação na tentativa de diminuir as lesões provocadas aos embriões sujeitos à criopreservação. São encontradas em elevadas concentrações nos peixes antárticos e é graças às suas propriedades que se torna possível a sobrevivência destes animais a temperaturas tão baixas. Porém, apesar de diminuir o ponto de congelação da solução, diminuir a concentração do crioprotector, reduzir a sensibilidade das células ao arrefecimento, a verdade é que não tem revelado melhorias nas TG aquando da sua utilização, o que faz com que actualmente não sejam aplicadas em circuitos comerciais de programas de OMTE (Makarevich et al., 2009).

O choque osmótico é outro factor capaz de provocar danos irreversíveis ao embrião. Durante o reaquecimento, tem que ocorrer a saída do crioprotector permeável do interior dos embriões. Se estes fossem colocados directamente em soluções isotónicas, dar-se-ia a difusão para o interior da célula, de água extracelular, mais rapidamente que a saída do crioprotector, levando à ruptura celular. Para ultrapassar este fenómeno, o embrião é sujeito a soluções com concentrações decrescentes ou, mais recentemente, o embrião é diluído numa solução hipertónica contendo sacarose como soluto não permeável para controlar o influxo de água (Dochi, Imai & Takakura, 1995). Outra situação em que ocorre variação rápida de volume com possíveis lesões celulares é antes da congelação, quando o embrião contacta pela primeira vez com o crioprotector. Neste caso, dá-se uma diminuição de volume do embrião por efluxo de água (ver figura 9), consequência do gradiente osmótico e, após a entrada do crioprotector na célula, para que haja equilíbrio osmótico, esta vai recuperando o seu volume. A utilização de crioprotectores muito permeáveis é preferível, pois diminui o tempo de exposição necessário para que o embrião fique em equilíbrio com o meio, antes da congelação e, para além disso, à descongelação, ao sair rapidamente das células previne o choque osmótico, havendo menor variação de volume do embrião, tanto à congelação, como no reaquecimento (Voelkel & Hu, 1991; Dochi, Imai & Takakura, 1995). Como vimos, são inúmeros os factores que têm que ser contornados para diminuir as lesões provocadas ao embrião durante a congelação. Para além disso, mesmo quando a técnica é executada teoricamente de forma correcta, esta pode ser extremamente agressiva para a organização celular dos embriões. Prova disso mesmo, é o facto de frequentemente as TG com embriões congelados serem inferiores às dos frescos. Por vezes, os embriões até morrem durante o processo. Quando presentes, os cristais de gelo intracelulares podem provocar a lise das membranas plasmáticas e o armazenamento em azoto líquido pode desnaturar os organelos e alterar as funções intracelulares, bem como conduzir à destruição da arquitectura do citoesqueleto embrionário (Dobrinsky, 1996).

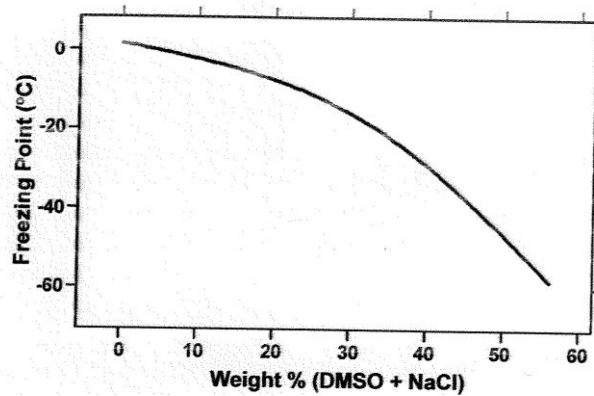
Pelos motivos referidos, por rotina, os técnicos de TE apenas sujeitam embriões de qualidade 1 ou 2 à criopreservação, uma vez que os de qualidade inferior não toleram da mesma forma esse processamento (Prather, Spire & Schalles, 1987; Seidel & Elsdén, 1989).

2.2 PROCEDIMENTO DE CONGELAÇÃO

2.2.1 Congelação lenta convencional

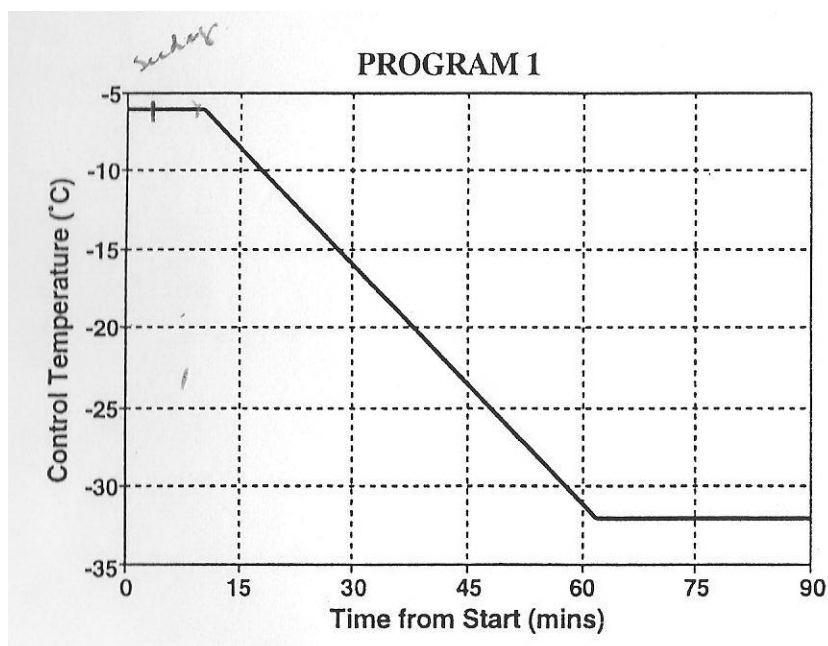
Nos anos 80, era prática comum o embrião passar por uma sucessão de banhos por meios com concentrações crescentes de glicerol, para evitar que houvesse choque osmótico, até se chegar à concentração de 1.4 M, em PBS suplementado com BSA. Aí permanecia durante 20 min à temperatura ambiente (20-25°C) para haver equilíbrio entre o embrião e o meio. Posteriormente, era acondicionado numa palhinha com capacidade de 0,25mL (French straw, IMV, Aigle, França; a partir de 1991) que era selada por calor ou químicos, como cloreto de polivinilo (Niemann, 1991; Wagtendonk, Daas, Kruip & Rall 1995; Palasz & Mapletoft, 1996; Woods, Benson, Agca & Critser, 2004; Leibo, 2008). Um ensaio realizado por Niemann (1984), em que se adicionava de uma só vez, o embrião ao meio de congelação com 1,4M glicerol, demonstrou que o número de embriões que após congelação apresentava fractura da ZP era significativamente superior ao grupo controlo que tinha sido sujeito a concentrações crescentes do mesmo crioprotector (Niemann, 1985). De seguida, as palhinhas contendo o embrião são colocadas no congelador de embriões, cuja câmara de congelação está à temperatura de -6 a -7 °C e , segundo o protocolo congelação dos ensaios realizados na III parte da presente tese, 3 minutos depois faz-se a indução artificial de formação de cristais de gelo (“seeding”) com uma pinça previamente arrefecida/mergulhada em azoto líquido (ver figura 12). O “seeding” permite iniciar a formação extracelular de cristais de gelo de forma controlada e continuada, evitando assim a congelação rápida de toda a água, dando tempo para esta abandonar as células à medida que aumenta a concentração extracelular de soluto (ver figura 10), desidratando-as, sem que ocorram os efeitos deletérios causados por congelação rápida. Os embriões permanecem entre -6 a -7 °C aproximadamente 10 minutos. Dada a variação de temperatura causada pelo calor de fusão latente e a variação da osmolaridade, é necessário estabilizar a temperatura e o volume celular. Depois a temperatura vai descendo a menos de 1 °C/min (~0,5° C/min) até aos -32°C/-35°C, levando à progressiva formação cristais de gelo extracelular de água. O aumento da concentração extracelular da solução causa desidratação intracelular e substituição da água por crioprotectores permeáveis (por difusão simples) (Niemman, 1991; Wagtendonk et al., 1995; Visintin et al., 2002; Woods et al., 2004).

Figura 10: Aumento da concentração do soluto à medida que a temperatura baixa (extraído de Leibo, 2008)



Após pelo menos 10 minutos a $-32^{\circ}\text{C}/-35^{\circ}\text{C}$ (ver figura 11), as células estarão suficientemente desidratadas e a concentração intracelular de crioprotector é então adequada para impedir efeitos deletérios causados por cristais de gelo e, aí as palhinhas são mergulhadas em azoto líquido (Niemman, 1991; Wagtendonk et al., 1995; Woods et al., 2004) e o embrião, juntamente com a porção extracelular não congelada, são vitrificados (Saragusty & Arav, 2011).

Figura 11: Rampa de congelação utilizada na criopreservação dos embriões transferidos nos ensaios da componente prática da presente tese (extraído do Manual de utilização do Freeze Control Model CL 2200, Cryologic)



As taxas de arrefecimento e de aquecimento, bem como a composição do meio crioprotector são factores críticos que influenciam a sobrevivência após a descongelação. Arrefecimentos demasiados lentos podem causar danos celulares por exposição prolongada a uma solução altamente concentrada, designado este fenómeno por “efeito solução”. Por outro lado, arrefecimentos muito rápidos causam lesões por formação intracelular de cristais de gelo. Embriões congelados adequadamente devem também ser descongelados a uma taxa de aquecimento correcta para evitar danos provocados por choque osmótico ou recristalização da água intracelular (Hochi, Semple & Leibo, 1996; Woelders & Chaveiro, 2004).

Inicialmente, os procedimentos de congelação convencional usavam crioprotectores permeáveis como o glicerol ou o DMSO. Nestes casos, após descongelação da palhinha, era necessário remover o crioprotector do interior da célula, pois este é tóxico a temperaturas elevadas. O embrião era sujeito a passagem por placas com concentrações decrescentes de crioprotector (“multistep dilution”) para que a saída do crioprotector para o meio extracelular fosse gradual e não houvesse entrada rápida de água para o interior das células, o que causaria morte celular e do embrião. Em alternativa ao “multistep dilution” utilizavam-se solutos não permeáveis como “amortecedores” osmóticos enquanto o crioprotector saía das células para o meio exterior (por exemplo, a sacarose).

Figura 12: Indução de formação de cristais com pinça arrefecida em azoto líquido (“seeding”) (original do autor)



2.2.2 Transferência directa

A transferência directa apresentou inúmeras vantagens em comparação com o “multistep dilution procedure”. Neste processo de descongelação, o embrião era exposto a concentrações decrescentes de crioprotector. Era necessário uma lupa, um trabalho mínimo de 1 a 2 horas em condições de laboratório e técnicos competentes para a realização do procedimento. Com a transferência directa, o embrião pode ser reaquecido na mesma palhinha em que foi congelado e ser transferido de imediato para a receptora, sem no entanto, haver decréscimos significativos da TG (Voelkel & Hu, 1991).

O factor decisivo para o sucesso da transferência directa é a minimização das lesões causadas por um possível choque osmótico. As lesões osmóticas irão ocorrer se o crioprotector intracelular não conseguir difundir rapidamente para o exterior, para prevenir o súbito influxo de água em sentido inverso, por gradiente osmótico. Após a descongelação da palhinha, tal facto provocaria o aumento do volume celular e lise das células. A utilização de crioprotectores altamente permeáveis, que permitem uma rápida difusão através da membrana celular, é fundamental para o sucesso do processo (Dochi, Imai & Takakura, 1995).

Com a introdução da sacarose nos procedimentos de diluição de substâncias crioprotectoras intracelulares, as técnicas tornaram-se mais rápidas e simples de executar, principalmente em condições de campo, pois a sacarose actua como tampão osmótico, mantendo constante a concentração do meio extracelular, regulando a velocidade de entrada da água e saída do crioprotector do embrião, prevenindo deste modo o choque osmótico (Niemann, 1991).

2.2.2.1 Transferência directa com glicerol

Massip, Zwahlen & Ectors (1987) congelaram embriões bovinos combinando 1,36 M de glicerol e 0,25M sacarose em PBS. Após a descongelação, a palhinha era agitada, como se tratasse de um termómetro, para expor o embrião à sacarose, resultando na saída controlada do crioprotector das células e, realizadas as transferências directas, obtiveram TG de 51,8% em 27 transferências.

No entanto, a transferência directa com utilização de glicerol não foi muito bem aceite por parte da indústria de transferência de embriões, possivelmente devido à existência de resultados muito variáveis (Voelkel & Hu, 1991).

2.2.2.2 Transferência directa com etilenoglicol

Até aos anos 90, os crioprotectores mais populares eram o glicerol e o DMSO cuja utilização tornava necessária a remoção faseada e/ou que fossem adicionados solutos não permeáveis com a função de estabilizadores osmóticos (Voelkel & Hu, 1991).

A elevada permeabilidade do etilenoglicol, possivelmente devido ao seu baixo peso molecular quando em comparação com os outros crioprotectores e, baixa toxicidade, permitiu evitar a necessidade de diluição gradual, com ou sem sacarose e, graças à sua rapidez de difusão através da membrana celular, os resultados têm sido menos variáveis do que a transferência directa com glicerol (Voelkel & Hu, 1991; Massip, 2001; Visitin et al., 2002).

Nibart & Humblot (1997) compararam TG de embriões congelados em 1,5M glicerol com 0,25M sacarose (4846 embriões transferidos), com a dos embriões congelados em etilenoglicol (1239 embriões transferidos), ambos com transferência directa. Elas foram respectivamente, de 48,5% e 50,5%, não apresentando pois, diferenças significativas. Concluíram assim que a TG com transferência directa é comparável à dos métodos convencionais e, que a obtenção de resultados semelhantes quanto ao crioprotector utilizado na transferência directa favorece a utilização do etilenoglicol por proporcionar um método mais simples no processamento e aplicação das palhinhas, em cenário de campo.

2.2.3 VITRIFICAÇÃO

Rall e Fahy (1985) introduziram a vitrificação como novo método de criopreservação de embriões de mamíferos, na ausência total de formação de cristais de gelo. Este método rompe com a metodologia utilizada nos protocolos de congelação lenta controlada e, consiste num processo físico pelo qual a solução é transformada numa matéria vítrea e amorfa, por arrefecimento rápido, sem a formação de cristais de gelo, mantendo as características de líquido na forma sólida (Rall & Fahy, 1985; Leibo et al., 1996; Palasz & Mapletoft, 1996; Dobrinsky, 2002). Para além da necessidade de arrefecimento rápido, são utilizadas soluções crioprotectoras (em concentrações superiores às utilizadas no método convencional de congelação lenta controlada), que diminuem a formação de cristais de gelo e aumentam a viscosidade a baixas temperaturas (Vajta, 2000).

No caso da congelação lenta, há a necessidade de manter um delicado equilíbrio entre vários factores, que no entanto, pode resultar em danos, como a formação de cristais de gelo, choque osmótico, efeito tóxico dos crioprotectores, concentração elevada de electrólitos intracelulares, lesões durante arrefecimento, fractura do embrião e da ZP e, alterações intracelulares dos organelos, do citoesqueleto e das ligações intercelulares. O problema é que, na vitrificação, a probabilidade de quase todos esses tipos de lesões aparecer é maior, excepto aquelas causadas pela formação de cristais de gelo. Por outro lado, a vitrificação tem revelado alguns aspectos positivos para além da eliminação completa de cristais de gelo, já que com as elevadas taxas de arrefecimento e reauecimento, o embrião está sujeito menos tempo às temperaturas entre +15°C a -5°C,

período em que ocorrem, frequentemente, alterações nas gotas lipídicas intracitoplasmáticas, no conteúdo lipídico das membranas e do citoesqueleto (Dobrinsky, 1996; Visintin et al., 2002).

Posteriormente a Rall e Fahy (1985), foram publicados diversos trabalhos com oócitos e embriões, explorando possibilidades de combinações, adição e remoção de crioprotectores, além de novos métodos e formas de armazenamento (Vajta & Kuwayama, 2006).

A fim de alcançar a vitrificação na prática, minimizando ao máximo a formação de cristais de gelo, e passagem rápida pelos +15°C a -5°C, é necessário altas taxas de arrefecimento (mergulho directo em azoto líquido, ≈2500°C/min), bem como elevadas concentrações de crioprotectores (≥ 30%) cuja toxicidade celular é um factor a ter em consideração (MacFarlane, 1986). Para evitar a formação de cristais de gelo é desejável que o embrião fique por um período de tempo considerável em contacto com a solução de vitrificação antes da congelação, o que em contrapartida, é prejudicial para as células do embrião devido ao efeito tóxico dos crioprotectores. Para tentar contornar esta situação, é comum em alguns protocolos de vitrificação, os embriões numa primeira fase serem sujeitos a uma solução diluída de crioprotector até estarem em equilíbrio, seguidos de uma curta exposição a uma solução mais concentrada designada por solução de vitrificação. Outra estratégia para diminuir os efeitos tóxicos das elevadas concentrações de crioprotector é através da selecção apropriada dos mesmos (o etilenoglicol é muito permeável e relativamente pouco tóxico), a utilização de uma associação de crioprotectores com o objectivo de não se fazer sentir tanto os efeitos tóxicos de cada um e, a utilização da sacarose (crioprotector não permeável) e de outras macromoléculas, que exerçam um efeito osmótico significativo, para além de reduzirem a toxicidade da solução de vitrificação, ao diminuir a concentração do crioprotector permeável (Kuleshova, MacFarlane, Trounson & Shaw, 1999).

O sucesso da vitrificação está associado à viscosidade da amostra, taxas de refrigeração - reaquecimento e volume da amostra. Estes factores são independentes e, os dois primeiros estão relacionados directamente e de forma positiva com o sucesso da vitrificação, isto é, quanto maior a viscosidade e a taxa de refrigeração, melhor serão os resultados. No entanto, o volume da amostra tem uma relação inversa e, a sua diminuição aumenta a probabilidade de sucesso (Vajta & Kuwayama, 2006; Yavin & Arav, 2007; Rios, Mucci, Kaiser & Alberio, 2010). A utilização de volumes pequenos, aumentando as taxas de arrefecimento e reaquecimento permitem a diminuição da concentração de crioprotector e consequentemente diminuição do seu efeito tóxico (Vajta & Kuwayama, 2006; Rios, Mucci, Kaiser & Alberio, 2010).

Os ensaios realizados posteriormente à vitrificação convencional tiveram em conta os aspectos referidos e, a nova modalidade de vitrificação que surgiu foi a vitrificação ultra-rápida. Nesta nova modalidade de criopreservação, os embriões são processados da

mesma forma que na vitrificação convencional, a alteração está na redução do volume da amostra, permitindo taxas de arrefecimento e reaquecimento superiores.

Vários métodos de vitrificação ultra-rápida têm sido descritos como, o “open pulled straw” (OPS), “cryoloop”, “microdrop”, “closed pulled straw”, entre outros.

2.2.3.1 Método “Open Pulled Straw” (OPS)

As palhinhas 0,25mL, utilizadas no método convencional, que permitem uma taxa de arrefecimento de 2500°C/min são alteradas no método OPS, passando o seu diâmetro para cerca de metade, o que implica a diminuição do volume do crioprotector. Consegue-se assim atingir um acréscimo de oito vezes mais no que diz respeito à velocidade de arrefecimento e de reaquecimento (≈ 20000 °C/min) (Vajta et al., 1997). Desta forma, com apenas 0,5 μ l de meio de vitrificação e taxas de arrefecimento muito elevadas, consegue-se que o embrião passe rapidamente pelas temperaturas de arrefecimento a que é sensível e lhe poderiam provocar danos (Massip, 2001).

A formação de cristais de gelo tem ocorrido muito mais rapidamente durante o processo de reaquecimento do que durante o arrefecimento, sempre que taxas de reaquecimento não são suficientemente rápidas (MacFarlane, 1986).

A vitrificação, apesar de não ser a primeira opção de criopreservação de embriões por parte dos técnicos de campo, apresenta-se como um método promissor e alternativo aos processos de criopreservação de embriões pelo método convencional. Tem como vantagens ser uma técnica mais rápida, quando comparada com os tradicionais programas de arrefecimento lento e dispensa o recurso a equipamentos caros, indispensáveis à criopreservação convencional (Vajta & Kuwayama, 2006).

2.2.3.2 Criopreservação de embriões produzidos *in vitro*

A técnica de produção *in vitro* (PIV) consiste na colheita de oócitos imaturos dos ovários de fêmeas vivas por punção ecoguiada dos folículos (“ovum-pick-up” (OPU)) ou colheita em fêmeas previamente abatidas. Posteriormente dá-se a maturação dos oócitos *in vitro*, fertilização *in vitro* (FIV), e manutenção do embrião em meio de cultura e atmosfera condicionada para que este se desenvolva (Galli et al., 2003).

A criopreservação de oócitos e de embriões PIV tem sido alvo de muita investigação, e já deixou de ser apenas uma técnica com fins experimentais, para ser também, uma “ferramenta de campo” para o melhoramento reprodutivo e genético das explorações (Schmidt & Niemann, 1999).

Os embriões PIV apresentam diferenças bioquímicas e morfológicas em relação aos embriões produzidos *in vivo*. Essas diferenças incluem o grau de compactação dos embriões PIV, alteração da expressão dos genes e aumento da quantidade de lípidos citoplasmáticos, o que aumenta ainda mais a sensibilidade dos primeiros às temperaturas

de refrigeração (Pugh, Tervit & Niemann, 2000; Dobrinsky, 2002; Seidel, 2006). Nestes casos, a vitrificação pode apresentar-se como uma boa opção por diminuir o tempo de exposição às temperaturas críticas de arrefecimento (+15 a -5°C) (Lewis, Lane & Vajta, 1999; Dobrinsky, 2002; Visintin et al. 2002).

A utilização de concentrações de 3,6M até 7,2M de etilenoglicol, junto com outros crioprotectores, apresenta bons resultados na criopreservação de embriões PIV por vitrificação e permite reaquecimento de uma só vez, evitando o “multistep dilution” (Visintin et al. 2002).

3 ENSAIOS EXPERIMENTAIS

3.1 INTRODUÇÃO GERAL

Uma parte considerável dos embriões transferidos por todo o mundo é sujeita a criopreservação, processo esse que mesmo quando executado correctamente, diminui a viabilidade dos embriões, o que se reflecte em TG inferiores às das TE a fresco (Niemann, 1991).

Vários estudos foram levados a cabo, com o intuito de identificar factores que influenciam o sucesso da criopreservação de embriões bovinos. No Ensaio I, avaliou-se retrospectivamente a fertilidade global da equipa A, relativamente à paridade das receptoras e ao tipo de embrião transferido. No Ensaio II foi analisado o impacto do intervalo de tempo entre o final da recolha e o início da congelação sobre a viabilidade dos embriões, ou seja, se a capacidade dos embriões transferidos de sobreviverem se manteve à medida que o intervalo de tempo a que foram sujeitos a condições ambientais (i.e., contaminação, manipulação, calor, luz e meio de cultura) aumentou, mesmo tendo sido todos os embriões avaliados pela sua forma morfológica como excelentes-bons, na altura da congelação. Este tema já foi abordado por vários investigadores, porém, não existe unanimidade entre as suas conclusões.

Como é sabido, o calor tem um impacto negativo nas explorações de bovinos de aptidão leiteira, tanto a nível de produção, como a nível reprodutivo. No capítulo da reprodução, geralmente está associado a uma TG muito baixa após IA, o que é um prejuízo económico para a exploração. Alguns ensaios demonstraram que, em períodos de calor, a TE é uma boa alternativa para manter em nível aceitável, a fertilidade de uma exploração. Os oócitos e embriões nos primeiros estádios de clivagem são mais susceptíveis aos efeitos provocados pelo stress hipertérmico do que embriões com 7 dias, o que pode permitir a obtenção de uma TG superior à conseguida por IA, nos meses quentes (Putney, Drost & Thatcher, 1989; Badinga et al. 1993; Drost et al., 1999; Al-Katanani et al., 2002; DeRensis & Scaramuzzi, 2003).

Na ausência de stress hipertérmico, vários investigadores concluíram que a qualidade dos oócitos de fêmeas superovuladas é inferior à das fêmeas que não receberam TS, bem como o transporte de espermatozóides é prejudicado no caso das primeiras, ocorrendo com frequência a recolha apenas de oócitos, más respostas superovulatórias e poucos embriões de boa qualidade (Hansen et al., 2001). Em fêmeas superovuladas em stress hipertérmico, os factores referidos são agravados e, para além disso, há diminuição da expressão do cio, alteração do desenvolvimento folicular, diminuição da competência dos oócitos e inibição do desenvolvimento embrionário. É uma realidade frequente, a diminuição do número de embriões transferidos por má RS, baixa taxa de fertilização e diminuição da qualidade dos embriões (Putney, Drost & Thatcher, 1988a; Putney et al., 1988b; Alfuraji, Nouty & Alibrahim, 1996; Hansen, 2001).

Com o Ensaio III da presente tese, testou-se a viabilidade de embriões classificados quanto à sua morfologia de excelentes-bons, produzidos *in vivo* por fêmeas dadoras sujeitas ao calor dos meses considerados quentes (Junho, Julho, Agosto e Setembro), para tentar saber até que ponto, não houve danos por esse facto. Pretendeu-se assim perceber se, nestes casos, ocorria um fenómeno semelhante ao que se passa com a utilização de sémen sexado, em que ocorre uma maior taxa de mortalidade embrionária, relativamente às gestações obtidas com sémen convencional (Carvalho et al., 2010; Underwood, Bathgate, Ebsworth, Maxwell & Evans, 2010).

Os dados recolhidos para realização dos três ensaios foram obtidos de programas de OMTE realizados por uma equipa licenciada, a qual será designada por equipa A, cuja actividade se desenvolveu na região de Entre Douro e Minho e Beira Litoral. Os dados analisados referem-se ao período, de 1999-2009 e a uma amostra total de 776 TE frescos e descongelados.

3.2 ENSAIO I

Este ensaio teve como objectivo a análise retrospectiva da actividade OMTE da equipa A, no sentido de se obter uma ideia da fertilidade global de uma unidade de TE, tendo em consideração factores como o tipo de embrião e a paridade da receptora, numa amostragem homogénea.

3.2.1 Material e métodos

Para a realização deste Ensaio foram seleccionadas receptoras de embriões descongelados (n=170) e de embriões frescos (n=37) num total de 207 transferências.

Apenas foram utilizadas receptoras da raça Holstein-Friesian, com assincronia positiva ou negativa em relação à dadora de até 12 horas, com CL3/CH3 de qualidade boa (1) ou razoável (2).

As novilhas utilizadas para receptoras eram fêmeas jovens, sem anomalias reprodutivas clinicamente detectáveis, com idades compreendidas entre 13 e os 18 meses. As vacas que foram utilizadas para receptoras não possuíam registo de idade, número de partos ou de problemas reprodutivos.

Os embriões transferidos (com idades de 7 a 7,5 dias), foram avaliados após a recolha e apresentavam morfologia excelente-bona (1) e, os estádios de desenvolvimento eram o de mórulas compactas, jovens blastocistos, blastocistos e blastocistos expandidos, tendo sido parte deles, posteriormente congelados em mini-palhinhas de forma lenta convencional, com 1,5M etilenoglicol + 0,25M de sacarose (ver figura 13) que de seguida foram, mergulhadas e armazenadas em azoto líquido por tempo indeterminado.

Figura 13: Esquema de enchimento da mini-palhinha (original do autor).

X	0,25M sacarose	ar	meio de manutenção	ar	1,5M etilenoglicol+embrião	ar	meio de manutenção	ar	meio de manutenção	X
---	----------------	----	--------------------	----	----------------------------	----	--------------------	----	--------------------	---

No dia da TE, a avaliação das receptoras (exame de estado geral e exame ginecológico), nomeadamente a avaliação do CL, foi procedimento realizado sempre pelo mesmo técnico que efectuou as TE. Caso a receptora fosse seleccionada procedia-se a uma anestesia epidural baixa e dava-se início ao processo de descongelação da palhinha contendo o embrião.

O protocolo para a descongelação da palhinha consistiu na remoção da palhinha do azoto líquido, mantê-la 10 segundos à temperatura ambiente e cerca de 10 segundos em banho-maria à temperatura de 35°C. Após a descongelação, a transferência ocorreu o mais rapidamente possível.

O método de sincronização deaios foi o da dupla administração de PGF_{2α} ou análogo de síntese, com 11 dias de intervalo e, posterior observação de cio, a partir das 48 horas após a segunda administração de PGF_{2α}, ou apenas, detecção visual de fêmeas em cio natural, tarefas estas que ficaram à responsabilidade dos produtores.

As TE foram realizadas por via não-cirúrgica, sempre pelo mesmo operador e apenas foram consideradas as transferências atraumáticas (ausência de vestígios de sangue na extremidade do “pistolet”).

Neste Ensaio não foi tida em consideração, a altura do ano em que foi realizada a TE ou a recolha, bem como, a altura em que foi realizado o diagnóstico de gestação, por ecografia/palpação (ver figura 14) ou a variação entre anos.

A variável novilha e vaca e, a variável congelados e frescos foram avaliadas individualmente utilizando o teste exacto de Fisher.

Figura 14: Diagnóstico de gestação precoce por ecografia (original do autor)



3.2.2 Resultados

Os resultados obtidos estão registados na tabela 9.

Tabela 9: Fertilidade global da equipa A

Embriões	Taxa de gestação após TE		Total
	Novilhas	Vacas	
Descongelados	59,8% ^a (70/117)	41,5% ^b (22/53)	54,1% (92/170)
Frescos	55,2% ^c (16/29)	25% ^d (2/8)	48,6% (18/37)
Total	58,9% (86/146)	39,6% (24/61)	

(a,b - $p < 0,05$; c,d - $p < 0,05$)

3.2.3 Discussão e conclusões

A TG dos embriões descongelados e transferidos para novilhas, obtida no presente ensaio, encontra-se dentro de valores considerados comercialmente aceitáveis (50%-60%, Niemann, 1991; 50%-70%, Callesen et al., 1996, citando várias equipas; 56,1% (n=3616) a 68,7% (n=774), Hasler, 2001) e registadas por equipas experientes.

Por outro lado, a TG das transferências a fresco não foram superiores à dos embriões descongelados ($p > 0,05$), ao contrário do que é relatado em inúmeros estudos, que referem

ser 10-15% mais elevada. As transferências a fresco podem alcançar os 80% (Hasler, 2004). A justificação para os resultados obtidos no presente ensaio poderá estar relacionada com a selecção das receptoras que receberam embrião fresco. Apesar da qualidade do embrião ser 1 e as receptoras terem CL de qualidade 1 ou 2, algumas delas sujeitas a TE a fresco, foram consideradas fêmeas repetidoras (animais que foram beneficiados mais de 3 vezes e não ficaram gestantes). Nestes casos, o objectivo da TE também passa por contornar as causas de infertilidade. Adicionalmente, é de referir que os grupos são numericamente muito diferentes (congelados, n=170; frescos, n=37).

Diferença significativa ($p < 0,05$) foi registada nas TE descongelados (41,5% vs 59,8%) e frescos (25% vs 55,2%), entre vacas e novilhas, respectivamente, sendo mais elevada nas últimas, o que está de acordo com os resultados de estudos anteriores (Callesen et al., 1996; Chagas e Silva et al., 1999; Hasler, 2001).

A utilização de vacas como receptoras de embrião fresco e descongelado pode não ser, portanto, melhor opção em termos comerciais, a não ser quando se torna necessário contornar determinadas situações de infertilidade dessas fêmeas.

3.3 ENSAIO II

Com este Ensaio pretendeu-se analisar retrospectivamente a influência do intervalo de tempo entre a recolha e o início da congelação, sobre a fertilidade após transferência de embriões descongelados para novilhas virgens Holstein-Friesian.

3.3.1 Material e métodos

Neste Ensaio, os embriões descongelados e transferidos (n=107) entre os anos de 1999 e 2009, foram distribuídos por três grupos, conforme o intervalo de tempo entre o final da recolha e o início da congelação (Grupo I: ≤ 2 horas, n=33 ; Grupo II: > 2 horas e ≤ 4 horas, n=67 ; Grupo III: > 4 horas, n=7).

As receptoras da raça Holstein-Friesian, apresentavam assincronia positiva ou negativa em relação à dadora, de 12 horas, com CL3/CH3 de qualidade boa (1) ou razoável (2), ao exame ginecológico antes da TE.

As novilhas utilizadas para receptoras eram fêmeas, virgens, sem anomalias reprodutivas clinicamente detectáveis, com idades compreendidas entre os 13 e os 18 meses.

Os embriões transferidos (com idades de 7 a 7,5 dias), foram avaliados após a recolha e apresentavam morfologia excelente-bom (1) e, os estádios de desenvolvimento eram o de mórulas compactas, jovens blastocistos, blastocistos e blastocistos expandidos, sendo posteriormente congelados em mini-palhinhas de forma lenta convencional, com 1,5M

etilenoglicol + 0,25M de sacarose e, de seguida, mergulhadas e armazenadas em azoto líquido por tempo indeterminado.

No dia da TE, realizaram-se os mesmos procedimentos descritos para o Ensaio I.

O método de sincronização de cio foi a dupla administração de PGF_{2α} ou análogos de síntese, com 11 dias de intervalo e, posterior detecção visual de cio a partir das 48 horas após a segunda administração de PGF_{2α}, ou apenas, detecção visual de fêmeas em cio natural, tarefas estas que ficaram à responsabilidade dos produtores.

As TE foram realizadas por via não-cirúrgica sempre pelo mesmo operador e apenas foram consideradas as transferências atraumáticas (ausência de vestígios de sangue na extremidade do “pistolet”).

Neste ensaio, não foi tida em consideração a altura do ano em que se realizou a TE ou a recolha, bem como, a altura em que foi realizado o diagnóstico de gestação ou ainda, a variação entre os anos.

Os dados foram analisados estatisticamente, segundo o teste exacto de Fisher.

3.3.2 Resultados

Os resultados obtidos encontram-se registados na tabela 10.

Tabela 10: Relação entre o intervalo de tempo desde o final da recolha ao início da congelação e a TG

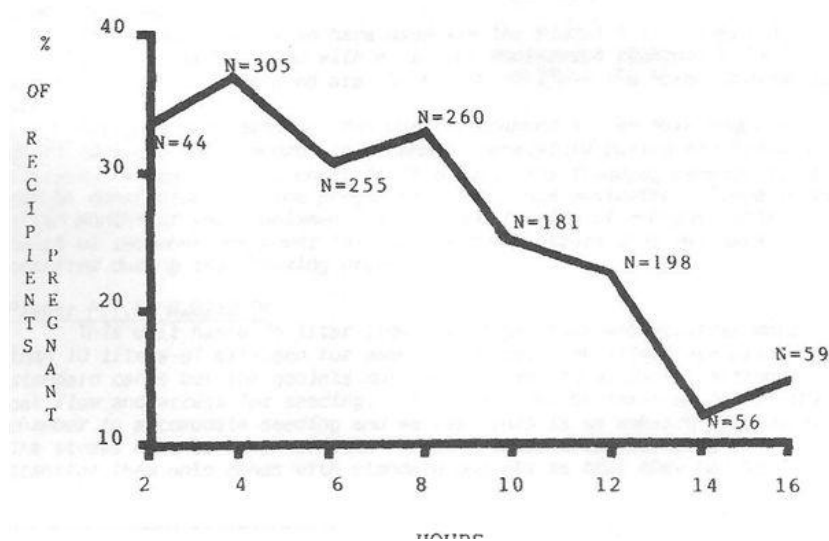
	Intervalo de tempo entre final da recolha e o início da congelação		
	Grupo I ≤ 2 horas	Grupo II 2 a 4 horas	Grupo III > 4 horas
TG %	63,6% ^a (21/33)	50,7% ^b (34/67)	57,1% ^c (4/7)

(a,b - p>0,05; a,c – p>0,05; b,c – p>0,05)

3.3.3 Discussão e conclusões

Wright (1985), com base em dados de programas de OMTE realizados entre o Verão de 1982 e o Verão de 1984, obteve uma amostra de 1358 transferências de embriões descongelados. A variação de tempo entre o final da recolha e início da congelação oscilou entre as 2 e as 16 horas (figura 15), o que se deve ao facto de algumas das recolhas terem sido feitas nas explorações e a congelação, na sede de laboratório. Todas as explorações ficavam a umas horas de distância, deste último.

Figura 15: Intervalo de tempo (horas) entre final da recolha e início da congelação e sua relação com a TG (extraído de Wright, 1985)



Perante os resultados, o autor decidiu congelar os embriões sempre, no local da recolha, ou seja, na própria exploração.

Hasler (2001), não considerou que a TG de embriões descongelados fosse afectada pela manutenção dos mesmos em meio de cultura, em condições de laboratório, por um período de 3h, entre o final da recolha e o início da congelação (ver tabela 11). Porém, neste trabalho, Hasler não teve em conta a avaliação morfológica do embrião, nem as características das receptoras (vaca vs novilha, assincronia ou qualidade do CL) e o intervalo de tempo considerado é manifestamente reduzido.

Tabela 11: Relação entre intervalo de tempo final da recolha e o início da congelação e a TG (adaptado de Hasler, 2001)

Intervalo de tempo entre recolha e congelação (min.)	Número de TE com embriões descongelados	Taxa de gestação (%)
0-30	85	54,1
31-60	418	56,0
61-90	722	56,0
91-120	507	56,2
121-150	264	53,0
151-180	106	55,7

Porém, o mesmo autor (Hasler, 2001), admite que em condições de campo, os embriões podem estar sujeitos a condições adversas, como temperaturas ambientais elevadas, que

poderiam conduzir à diminuição da viabilidade dos mesmos, em função do tempo de exposição àquelas condições adversas.

Ponsart et al. (2006) em experiências de campo realizadas em França concluíram que a TG não era influenciada pelo intervalo de tempo entre o final da recolha e o início da congelação, como o demonstra a Tabela 12.

Tabela 12: Relação entre o intervalo de tempo final da recolha e o início da congelação e a TG (adaptado de Ponsart et al., 2006)

Intervalo de tempo entre recolha e congelação	Número de TE descongelados	Taxa de gestação (%)
≤4horas	393	51,9
>4horas	155	55,5

Tal como Hasler (2001), Ponsart et al. (2006), não tiveram em conta a qualidade dos embriões nem a assincronia entre receptora e dadora. Para além disso, a definição dos dois grupos em análise é muito abrangente, podendo mascarar algumas situações.

Aoyagi et al. (1990) citados por Gordon (2002), constataram que a TG a partir das 3h (desde o final da recolha até ao início da congelação) reduzia-se consideravelmente (65% vs 43%).

No presente Ensaio, os resultados parecem apontar para a diminuição numérica da TG entre os diferentes grupos de fêmeas, à medida que o intervalo de tempo recolha - congelação dos embriões aumenta, sem no entanto as diferenças serem significativas ($p > 0,05$), excepção feita para o grupo III que apresenta uma amostragem muito reduzida e desequilibrada.

A TG das novilhas e, para grupos numericamente desiguais, variou de 63% a 50,7% (63.63%, 50.7% e 57.1% para o grupo I, II e III, respectivamente). Estes valores parecem ser da mesma ordem de grandeza dos obtidos por Hasler (2001) e por Ponsart et al. (2006).

Podemos então concluir que parece haver uma tendência numérica, não estatisticamente significativa, para que intervalos de tempo menores, entre a recolha e início de congelação possam corresponder a taxas de gestação superiores. Esta situação poderá acentuar-se quando as condições ambientais são adversas ou a receptora for uma fêmea de risco.

3.4 ENSAIO III

Como já foi referido na presente tese, temperaturas ambientais elevadas são adversas para a fertilidade em bovinos, sobretudo de aptidão leiteira e em lactação.

Neste Ensaio pretendeu-se avaliar o efeito do stress hipertérmico na altura do TS até à recolha sobre a viabilidade dos embriões congelados, a partir dos dados registados pela Equipa A.

O outro objectivo foi analisar o efeito da época do ano sobre a fertilidade após a transferência do embrião descongelado.

3.4.1 Material e métodos

Para a realização deste trabalho, foram analisadas 176 TE com embriões descongelados realizadas entre os anos de 1999 e 2009.

As receptoras da raça Holstein-Friesian utilizadas para o ensaio foram novilhas virgens (n=120), sem anomalias reprodutivas clinicamente detectáveis, com idades compreendidas entre os 13 e 18 meses e vacas (n=56), sem registo de idade, número de partos ou indicação de problemas de infertilidade. Todas as fêmeas apresentavam assincronia positiva ou negativa, em relação à dadora, de até 12 horas e com CL3/CH3 de qualidade boa (1) ou razoável (2) ao exame ginecológico, antes da TE.

Os embriões transferidos (com idades de 7 e 7,5 dias) foram avaliados após a recolha e apresentavam morfologia excelente-bom (1) e, os estádios de desenvolvimento eram o de mórulas compactas, jovens blastocistos, blastocistos e blastocistos expandidos, sendo posteriormente congelados em mini-palhinhas, da forma lenta convencional com 1,5M etilenoglicol + 0,25M de sacarose e, de seguida, mergulhadas e armazenadas em azoto líquido por tempo indeterminado.

No dia da TE, os procedimentos realizados foram semelhantes aos descritos no material e métodos do Ensaio I.

O método de sincronização de cio foi o da dupla administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou análogo de síntese, com 11 dias de intervalo e, posterior detecção visual de cio a partir das 48 horas após a segunda administração de $\text{PGF}_{2\alpha}$, ou apenas, detecção visual de fêmeas em cio natural, tarefas estas que ficaram à responsabilidade dos produtores.

As TE foram realizadas sempre pelo mesmo operador e apenas foram consideradas as transferências atraumáticas (ausência de vestígios de sangue na extremidade do “pistolet”).

As TE foram agrupadas consoante a época do ano em que foi realizada a recolha do embrião e a época em que foi transferido. Os meses de Junho, Julho, Agosto e Setembro foram considerados os meses quentes e, ao invés, os meses de Outubro, Novembro, Dezembro, Janeiro, Fevereiro, Março, Abril e Maio foram considerados os meses frios.

Os dados foram trabalhados estatisticamente pelo teste exacto de Fisher.

3.4.2 Resultados

Os resultados obtidos no presente Ensaio são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Relação entre a época da recolha e da transferência embrionária e a TG

	Recolha nos meses frios		Recolha nos meses quentes	
	Transferências meses quentes	Transferências meses frios	Transferências meses quentes	Transferências meses frios
Novilhas	58,4% ^a (14/24)	60,7% ^b (37/61)	41,7% ^c (5/12)	60,9% ^d (14/23)
Vacas	45% ^e (9/20)	38,5% ^f (10/26)	33,3% ^g (2/6)	25% ^h (1/4)

(a,e - $p < 0,05$; b,f - $p < 0,05$; c,g - $p < 0,05$; d,h - $p < 0,05$)

3.4.3 Discussão e Conclusões

As novilhas foram significativamente ($p < 0,05$) melhores receptoras do que as vacas, contudo, para o mesmo tipo de receptora, não houve diferenças significativas entre as épocas do ano em que foram realizadas as recolhas e transferências. Contudo, no caso das novilhas, os valores mais baixos de TG encontram-se nas transferências realizadas nos meses quentes e, o valor mais baixo foi calculado, no grupo que receberam embriões congelados e transferidos nos meses quentes. Desta forma, tanto os resultados obtidos nas novilhas, como nas vacas estão de acordo com os de alguns ensaios (Putney, Drost & Thatcher, 1989; Badinga et al. 1993; Drost et al., 1999; Al-Katanani et al., 2002; DeRensis & Scaramuzzi, 2003) que aconselham a transferência de embriões descongelados em explorações fustigadas por elevadas temperaturas ambientais, por forma melhorar a fertilidade, que se encontra diminuída após IA.

Os resultados das receptoras vacas podem ser encarados ainda de outra forma. Se excluirmos o grupo com a amostra mais pequena ($n=4$; recolha nos meses quentes x transferências nos meses frios x vacas), o grupo que apresentou TG mais baixa, foi o das vacas que receberam embriões congelados e transferidos nos meses quentes, verificando-se o mesmo com as novilhas.

Torna-se necessária a realização de um ensaio mais completo, com amostras significativamente maiores, para se poder entender se há ou não, efeitos prejudiciais acumulados, na viabilidade do embrião, provocados pelo calor durante a recolha e/ou transferência.

Parece haver uma tendência numérica para uma quebra de fertilidade das novilhas nas transferências realizadas nos meses quentes, independentemente da época da recolha. Nas vacas, tal situação é de difícil apreciação, dada a exiguidade da população em análise.

4 CONCLUSÕES GERAIS

A eficiência produtiva da vaca leiteira é o objectivo principal de um produtor de leite, que é maior no início da lactação e diminui gradualmente com o avanço da mesma. Daí, o manejo reprodutivo ser fundamental, independentemente dos outros objectivos da exploração, tendo em vista os benefícios que a gestação provoca na funcionalidade da glândula mamária e na eficiência da conversão alimentar.

As fêmeas podem ser beneficiadas por cobrição, IA ou TE. Esta decisão está relacionada com as características da fêmea, objectivos da exploração e época do ano/condições ambientais.

A produção de fêmeas de substituição é outro dos objectivos do manejo reprodutivo, com vista a reciclar e/ou aumentar o número de produtoras/reprodutoras de qualidade genética superior à ascendência e, dotadas de capacidade de a transmitir à descendência, para que se inicie novo ciclo ainda mais eficiente.

Enquanto que a IA é uma técnica de melhoramento animal que dissemina o valor genético de um touro de qualidade superior, a TE permite que a superioridade genética da fêmea dadora seja também disseminada para receptoras de qualidade inferior, cuja única função é levar a gestação até termo, que culmina no nascimento de uma cria geneticamente valiosa.

Com o desenvolvimento das técnicas de criopreservação de embriões, permitiu-se neste caso, no ramo da pecuária, que embriões excedentários por ausência de receptoras aptas, em número adequado, fossem criopreservados por tempo indefinido. A possibilidade de disseminação global de genética de qualidade superior, bem como a de melhorar as TG de explorações leiteiras cuja fertilidade após IA se encontra significativamente diminuída, pelos efeitos adversos provocados pelo stress hipertérmico, são outras vantagens da criopreservação de embriões.

Os resultados dos ensaios da presente tese, utilizando apenas embriões criopreservados mostraram que as novilhas foram significativamente ($p < 0,05$) melhores receptoras do que as vacas, sendo estas últimas um sério factor de risco aquando da sua utilização como receptoras.

Relativamente ao intervalo de tempo final da recolha-início da congelação, à medida que este aumentou, registou-se uma tendência numérica para a diminuição da TG. Porém, as diferenças não foram significativas ($p > 0,05$).

O stress hipertérmico parece afectar a TG, quer nas novilhas, quer nas vacas, sobretudo quando as recolhas/congelação e TE foram realizadas nos meses quentes. No entanto, não houve diferenças significativas relativamente a outros grupos em análise ($p > 0,05$).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, G.P. (1994). Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization & superstimulation. *Theriogenology*, 41, 19 – 24.
- Adams, G.P., Jaiswal, R., Singh, J. & Malhi, V. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69, 72-80.
- Aerts, J.M.J. & Bols, P.E.J. (2010). Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: antral development, exogenous influence and future prospects. *Reproduction Domestic Animals*, 45, 180-187.
- Alarcón, M.A., Galina, C.S., Corro, M.D. & Asprón, M.A. (2010). Embryo transfer, a useful technique to be applied in small community farms? *Trop Anim Health Prod*, 42, 1135 – 1141.
- Alcivar, A.A., Maurer, R.R. & Anderson, L.L. (1992). Endocrine changes in beef heifers superovulated with follicle-stimulating hormone (FSH-p) or human menopausal gonadotropin. *J. Anim. Sci.*, 70, 224-231.
- Alfuraj, M.M., El-Nouty, F.D., & Alibrahim, R.M. (1996). Seasonal variations in superovulatory responses of Holstein cow serum gonadotrofin under semi-arid environment. *Journal of Arid Environment*, 34, 371-378.
- Al-Katanani, Y.M., Drost, M., Monson, R.L., Rutledge, J.J., Krininger, C.E., Block, J., Thatcher, W.W. & Hansen, P.J. (2002). Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat conditions. *Theriogenology*, 58, 171-182.
- Amstrong, D.T. (2001). Effects of maternal age on oocyte development competence. *Theriogenology*, 55, 1303-1322.
- Anne, P., Trouson, A.O., Aarts, M.H. & McPhee, S. (1980). Bovine embryo recovery by filtration of non-surgical flushings. *Theriogenology*, 13, 281-285.
- Ashworth, Ch.J. (1992). Synchrony embryos-uterus. *Animal Reproduction Science*, 28, 259 – 267.
- Association Europeene de Transfert Embryonaire (A.E.T.E.). Acedido em Mar. 11, 2011 em <http://www.aete.eu/>
- Atwell, J.K. (1987). The international movement of embryos and disease control: a regulatory perspective. *Theriogenology*, 27, 5-8.
- Badinga, L., Thatcher, W. W., Diaz, T. , Drost, M. & Wolfenson, D. (1993). Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating holstein cows. *Theriogenolgy*, 39, 797-810.
- Ball, P.J.H. & Peters, A.R. (2004). *Reproduction in cattle*. (3ª edição). Oxford: Blackwell Publishing. pp.191-214.
- Balla, E., Tríbulo, H., Barberis, F., Tríbulo, R., Barberis, S., Reano, I., M.F. Martinez & Bó, G. A. (2007). Utilization de sémen sexado en protocolos de superestimulacio en vacas holstein. In *VII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba (Argentina)*, pp. 282.
- Barnes, F.L., (2000). The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology*, 53, 649 – 658.
- Bartolome, J.A., Van Leeuwen, J.J.J., Thieme, M., Sa´Filho, O.G., Melendez, P., Archbald, L.F. & Thatcher, W.W. (2009). Synchronization and resynchronization of insemination in

- lactating dairy cows with the CIDR insert and Ovsynch protocol. *Theriogenology*, 72, 869 – 878.
- Bényei, B., Gáspárdy, A. & Barros, C.W.C. (2001). Changes in embryo production results and ovarian recrudescence during the acclimatisation to the semiarid tropics of embryo donor Holstein-Friesian cows raised in a temperate climate. *Animal Reproduction Science*, 68, 57 – 68.
- Betteridge, K.J. (2003). A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Animal Reproduction Science*, 79, 203–244.
- Betteridge, K.J. (1977). Superovulation embryo transfer in farm animals: Review of techniques and applications. Monogr.16, Department of Agriculture, Ottawa (Canadá), pp. 1-31.
- Bilby, C.R., Bader, J.F., Salfen, B.E., Youngquist, R.S., Murphy, C.N., Garverick, H.A., Crooker, B.A. & Lucy, M.C. (1999). Plasma GH, IGF-I, and conception rate in cattle treated with low doses of recombinant bovine GH. *Theriogenology*, 51, 1285-1296.
- Bleach, E.C.L., Muttukrishna, S., Cunningham, F.J., Knight, P.G. & Glencross, R.G. (1996). Effect of inhibin immunization using different synthetic peptide fragments of the bovine α – subunit on plasma anti-inhibin titres, plasma FSH concentrations and incidence of multiple ovulation in heifers. *Animal Reproduction Science*, 41, 1–12.
- Bó, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A. & Mapletoft, R.J. (1995). Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, 43, 31- 40.
- Bó, G.A., Barusselli, P.S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, L., Caccia, M., Tribulo, R., Tribulo, H. & Mapletoft, R.J. (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57, 53 – 72.
- Bó, G.A., Barusseli, P.S., Pablo, M.C. & Martins, C.M. (2006). The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*, 65, 89-101.
- Bó, G.A., Guerrero, D.C. & Adams, G.P. (2008). Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology*, 69, 81 – 87.
- Boland, M.P., Goulding, D. & Roche, J.F. (1991). Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, 35, 5-17.
- Callesen, H., Bak, A. & Greve, T. (1992). Use of PMSG antiserum in superovulated cattle?. *Theriogenology*, 38, 959 – 968.
- Callesen, H., Liboriussen, T. & Greve, T. (1996). Practical aspects of multiple ovulation-embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Science*, 42, 215 – 226.
- Carvalho, J.O., Sartori, R., Machado, G.M., Mourão, G.B. & Dode, M.A.N. (2010). Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. *Theriogenology*, 74, 1521-1530.
- Castro Neto, A.S., Sanches, B.V., Binelli, M., Seneda, M.M., Perri, S.H. & Garcia, J.F. (2005). Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. *Theriogenology*, 63, 1249–1255.
- Chagas e Silva, J.N. (Novembro, 1991). Ovulação múltipla e transferência de embriões em bovinos. Palestra proferida no II encontro dos Médicos Veterinários da beira interior, Guarda. pp. 1-25.

Chagas e Silva, J.N. (2009). Transferência embrionária em bovinos leiteiros na Ilha Graciosa (Açores): Programa experimental de transferência de embriões sexados e congelados da raça Holstein Frísia. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 104, 25-30.

Chagas e Silva, J.N., Cidadão, M.R. & Lopes da Costa, L. (1999). Effect of parity and type of estrus of recipient on pregnancy rate following embryo transfer in dairy cattle. In *Associação Europeia de Transferência de Embriões (15º Encontro Científico)*. Lyon, (França): Foundation Marcel Merieux. AETE. pp. 132.

Chagas e Silva, J.N., Lopes da Costa, L. & Robalo Silva, J. (2002a). Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers. *Animal Reproduction Science*, 69, 1-8.

Chagas e Silva, J.N., Lopes da Costa, L. & Robalo Silva, J. (2002b). Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology*, 58, 51-59.

Chagas e Silva, J. & Lopes da Costa, L. (2005). Lutetrophic influence of early bovine embryos and the relationship between plasma progesterone concentrations and embryo survival. *Theriogenology*, 64, 49-60.

Chebel, R.C., Demétrio, D.G.B. & Metzger, J. (2008). Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology*, 69, 98 – 106.

Chorfi, Y., Lanevski, A., Dupras, R., Ginard, V. & Tremblay, A., (2007). Serum biochemical parameters and embryo production during superovulatory treatment in dairy cattle. *Research in Veterinary Science*, 83, 318 – 321.

Cole, J.A. & Hansen, P.J. (1993). Effects of administration of recombinant bovine somatotropin on the responses of lactating and non lactating cows to heat stress. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 203, 113-117.

Cupp, A.S., Stumpf, T.T., Kojima, F.N., Werth, L.A., Wolfe, M.W., Roberson, M.S., Kittok, R.J. & Kinder, J.E., (1995). Secretion of gonadotrophins change during the luteal phase of the bovine oestrous cycle in the absence of corresponding changes in progesterone or 17 β -oestradiol. *Animal Reproduction Science*, 37, 109 – 119.

Curtis, J.L., Elsdon, R. P. & Seidel, G. E. Jr. (1981). Non-surgical transfer of bovine embryos. *Theriogenology* ,15, pp. 124.

Curtis, J.L., (1991). *Cattle Embryo Transfer Procedure: An Instructional Manual for the Rancher, Dairyman, Artificial Insemination Technician, Animal Scientist, and Veterinarian*. California: Academic Press, Inc., California (USA). 31-57.

Cushman, R.A., DeSouza, J.C., Hedgpeth, V.S. & Britt, J.H. (2001). Effects of long-term treatment with recombinant bovine somatotropin and estradiol on hormone concentrations and ovulatory response of superovulated cattle. *Theriogenology*, 55, 1533 –1547.

Dalessandro, R.A. (Setembro, 1999). III curso de transferência de embriões em bovinos. São Paulo (Brasil). (Policopiado).

Dejarnette, J.M., Nebel, R.L. & Marshall, C.E., (2009). Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology*, 71, 49 – 58.

Dobrinsky, J.R., (1996). Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, 45, 17 – 26.

- Dobrinsky, J.R., (2002). Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 57, 285–302.
- D’Occhio, M.J., Sudha, G., Jillelia, D., Whyte, T., Maclelian, L.J., Walsh, J., Trigg, T.E. & Miller, D. (1997). Use of a GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulations in heifers superstimulated with FSH: A new model for superovulation. *Theriogenology*, 47, 601– 613.
- Dochi, O., Imai, K. & Takakura, H. (1995). Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethyleneglycol. *Animal Reproduction Science*, 38, 179-185.
- Dochi, O., Takahashi, K., Hirai, T., Hayakawa, H., Tanisawa, M., Yamamoto, Y. & Koyama, H. (2008). The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. *Theriogenology*, 69, 124–128.
- Donaldson, L.E. & Ward, D.N. (1987). LH effects on superovulation and fertilization rates. *Theriogenology*, 27, pp. 225. (abstract).
- Donaldson, L.E. & Ward, D.N. (1985). Superovulation in cattle: Dose response to FSH- with and without LH contamination. *Theriogenology* 23, pp.189. (abstract).
- Drost, M., Ambrose J.D., Thatcher, M.J., Cantrell C.K., Wolfsdorf K.E., Hasler J.F. & Thatcher W.W. (1999). Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology*, 52, 1161-1167.
- Evans, B.R. (1998). The prospect for international regulatory interventions in embryo transfer and reproductive technologies in the next century. *Theriogenology*, 51, 71-80.
- Farin, P.W., Moore, K. & Drost M. (2007). Assisted reproductive technologies in cattle. In Youngquist, R.S. & Threlfall, W.R. (Eds.), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, (2^a edition), USA, Saunders Elsevier, 496 – 508.
- Fernandes, C.A.C. (2005). *Terapia hormonal na reprodução de bovinos*. Alfenas (Brasil). (policopiado).
- Freret, S., Grimard, B., Ponter, A.A., Joly, C., Ponsart, C. & Humblot, P. (2006). Reduction of body-weight gain enhances in vitro embryo production in overfed superovulated dairy heifers. *Reproduction*, 131, 783-794.
- Galli, C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S., Lagutini, I. & Lazzari, G. (2003). Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59, 599-616.
- Garner, D.L. & Seidel, Jr. G.E. (2008). History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*, 69, 886-895.
- Galvão, K.N. & Santos, J.E.P. (2010). Factors affecting synchronization and conception rate after the ovsynch protocol in lactating holstein cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 439-446.
- Givens, M.D. & Marley, S.D. (2008). Approaches to biosecurity in bovine embryo transfer programs. *Theriogenology*, 69, 129–136.
- Gong, J.G., Wilmut, I., Bramley, T.A. & Webb, R. (1996). Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology*, 45, 611-622.

- Gong, J.G., Armstrong, D.G., Baxter, G., Hogg, C.O., Garnsworthy P.C. & Webb R. (2002). The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology*, 57, 1591-1602.
- Gordon, I. (1994). Storage and cryopreservation of oocytes and embryos. In: *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Wallingford, UK; CAB international, 293-328.
- Gordon, I. (2002). Controlled Reproduction in Cattle & Buffaloes: Controlled reproduction in farm animals series. Dublin; CAB International. 255 – 266.
- Gordon, I. (2003), *Laboratory Production of Cattle Embryos: Biotechnology in Agriculture Series*. (2^a edição). London; Cabi Publishing. 135–140.
- Goulding, D.H., Williams, J.F., Roche & Boland, M.P. (1991). Superovulation in heifers using either pregnant mares serum gonadotrophin or follicle stimulating hormone during the mid luteal stage of the estrous cycle. *Theriogenology*, 36, 949-958.
- Grasso, F., Guilbault, L.A., Roy, G.L. & Lussier, J.G. (1989). Ultrasonographic determination of ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. *Theriogenology*, 31, 1209-1220.
- Gray, B.W., Cartee, R.E., Stringfellow, D.A., Riddell, M.G., Riddell, K.P. & Wright, J.C. (1992). The effects of FSH-priming and dominant follicular regression on the superovulatory response of cattle. *Theriogenology*, 37, 631-639.
- Greve, T. (1980). Bovine egg transplantation – Superovulation, non-surgical recoveries and transfers. *Nord. Vet.-Med.*, 32, 513 – 522.
- Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., Hoier, R. & Assey, R. (1995). The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology*, 43, 41-50.
- Greve, T., Lehn-Jensen, H. & Rasbech, N.O. (1977). Non-surgical recovery of bovine embryos. *Theriogenology*, 7, 239-250.
- Guerin, B., Nibart, M., Marquant-Le Guienne, B. & Humblot, P. (1997). Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. *Theriogenology*, 47, 33–42.
- Guerra, A.G., Rodríguez, D., Villareal, J., Albrecht A. & Brogliatti, G. (2007). Respuesta ovarica y número de embriones transferibles en donantes superestimuladas com diferente score corporal. In: *VII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba (Argentina) pp. 278*.
- Guerra, A.G., Bó, G. A., Villareal, J., Albrecht, A. & Brogliatti, G. (2007). Respuesta ovarica y número de embriones en donantes superestimuladas en diferentes dias del ciclo estral. In: *VII Simposio Internacional de Reproducción Animal. Córdoba (Argentina) pp. 279*.
- Guilbault, L.A., Lussier, J.G. & Grasso, F. (1992). Interrelationships of hormonal and ovarian responses in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. *Theriogenology*, 37, 1029–1040.
- Hackett, A.J., Durnford, R., Mapletoft, R.J. & Marcus, G.J. (1993). Location and status of embryo in the genital tract of superovulated cows 4 to 6 days after insemination. *Theriogenology*, 40, 1147-1153.
- Hansen, P.J., Drost, M., Rivera, R.M., Paula-Lopes, F.F., Al-Katanani, Y.M., Krininger, C.E. & Chase, C.C. (2001). Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology*, 55, 91 – 103.

- Hamawaki, H., Hirai, T., Takimoto, A., Ideta, A. & Aoyagi, Y. (1999). Superovulation and embryo transfer in holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology*, 71, 68-73.
- Hasler, J.F., Brooke, G.P. & McCauley, A.D. (1981). The relationship between age and response to superovulation in holstein cows and heifers. *Theriogenology*, 15, 109. (abstract).
- Hasler, J.F., McCauley, A.D., Schermerhorn, E.C. & Foote, R.H. (1983). Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, 19, 83-99.
- Hasler, J.F., McCauley, A.D., Lathrop, W.F. & Foote, R.H. (1987). Effect of donor-recipient interactions on pregnancy rate in a large scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, 27, 139-168.
- Hasler, J.F., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q. & Stokes, J.E. (1997). Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethyleneglycol. *Theriogenology*, 48, 563–579.
- Hasler, J.F. & Thatcher, W.W. (1999). Conception rate after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in florida. *Theriogenology*, 52, 1161-1167.
- Hasler, J.F. (2001). Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 56, 1401–1415.
- Hasler, J.F., Bilby, C.R., Collier, R.J., Denham, S.C. & Lucy, M.C. (2003). Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology*, 59, 1919-1928.
- Hasler, J.F. (2004). Factors influencing the success of embryo transfer in cattle. 23^o Congresso Mundial de Buiatria. Québec (Canada). Acedido em Fev. 19, 2011, em <http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2004/WBC2004-Hasler-simple.pdf>
- Hawk, H.W. (1988). Gamete transport in superovulated cow. *Theriogenology*, 29, 125–142.
- Hayakawa, H., Hirai, T., Takimoto, A., Ideta, A. & Aoyagi, Y. (2009). Superovulation and embryo transfer in holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology*, 71, 68 – 73.
- Hay, J.H., Phelps, D.A., Hanks, D.R. & Foote, W.D. (1989). Sequential uterine horn versus simultaneous total uterine flush to recover bovine embryos nonsurgically. *Theriogenology*, 33, 563-567.
- Herrler, A., Elsaesser, F., Parvizi, N. & Niemann, H. (1991). Superovulation of dairy cows with purified FSH supplemented with difined amounts of LH. *Theriogenology*, 35, 633 – 643.
- Herrler, A., Einspanier, R., Schams, D. & Niemann, H. (1994). Effect of recombinant bovine somatotropin (rBST) on follicular IGF-I contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. *Theriogenology*, 41, 601- 61.
- Hochi, S., Semple, E. & Leibo, S.P. (1996). Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 46, 837–847.
- Huhtinen, M., Rainio, V., Aalto, J., Bredbacka, P. & Maki-Tanila, A. (1991). Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. *Theriogenology*, 37, 457–463.
- Hyttel, P., Callesen, H., Greve, T. & Schmidt, M. (1991). Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology*, 35, 91-108.

International Embryo Transfer Society (IETS). Acedido em Fev. 17, 2011. Disponível em www.iets.com.

Jainudeen, M.R., Wahid, H., & Hafez, E.S.E. (2000). Ovulation induction, embryo production and transfer. In *Hafez B. & Hafez E.S.E. Reproduction in Farm Animals (7th Edition)*. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 405-430.

Kafi, M. & McGowan, M.R. (1997). Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science*, 48, 137-157.

Karow, A.M. (2001). Cryobiology 2001 for mammalian embryologists. Acedido em Jun. 17, 2011, em <http://www.xytextinternational.com/pdf/cryobiology.pdf>

Kelly, P., Duffy, P., Roche, J.F. & Boland, M.P. (1997). Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Animal Reproduction Science*, 46, 1 – 14.

Kim, H.I., Son, D.S., Yeon, S.H., Choi, S.H., Park, S.B., Ryu, I.S., Suh, G.H., Lee, D.W., Lee, C.S. & Yoon, J.T. (2000). Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in holstein cows. *Theriogenology*, 55, 937-945.

Kimura, K., Hirako, M., Iwata, H., Aoki, M., Kawaguchi, M. & Seki, M. (2007). Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminium hydroxide gel. *Theriogenology*, 68, 633 – 639.

Kohram, H., Bousquet, D., Durocher, J. & Guilbault, L.A. (1998). Alteration of follicular dynamics and superovulatory responses by gonadotropin releasing hormone and follicular puncture in cattle: a field trial. *Theriogenology*, 49, 1165-1174.

Kuleshova, L. L., MacFarlane, D. R., Trounson, A. O. & Shaw, J. M. (1999). Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethyleneglycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology*, 38, 119–130.

Lafri, M., Ponsart, C., Nibart, M., Durand, M., Morel, A., Jeanguyot, N., Badinand, F., DeMari, K. & Humblot, P. (2002). Influence of CIDR treatment during superovulation on embryo production and hormonal patterns in cattle. *Theriogenology*, 58, 1141–1151.

Lamb, G.C., Brown, D.R., Larson, J.E., Dahlen, C.R., DiLorenzo, N., Arthington, J.D. & DiCostanzo, A. (2008). Effect of organic or inorganic trace mineral supplementation on follicular response, ovulation, and embryo production in superovulated Angus heifers. *Animal Reproduction Science*, 106, 221 – 231.

Leibo, S.P. (2008). Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology*, 69, 37-47.

Leibo, S.P., Martino, A., Kobayashi, S. & Pollard, J.W. (1996). Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Animal Reproduction Science*, 42, 45–53.

Lerner, S.P., Thayne, W.V., Baker, R.D., Henschen, T., Meredith, S., Inskip, E.K., Dailey, R.A., Lewis, P.E. & Butcher, R.L., (1986). Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 63, 176 – 183.

Leroy, J.L.M.R., Opsomer, G., DeVliegher, S., Vanholder, T., Goosens, L., Geldhof, A., Bols, P.E.J., Kruif, A. & VanSoom, A. (2005). Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology*, 64, 2022–2036.

- Lewis, I.M., Lane, M.W. & Vajta, G. (1999). Pregnancy rates following transfer of in vitro produced bovine embryos vitrified by the open pulled straw (OPS) method. *Theriogenology*, 168. (abstract).
- Li, C., Zhu, Y.L., Xue, J.H., Zhang, S.L., Ma, Z. & Shi, Z.D. (2009). Immunization against inhibin enhances both embryo quantity and quality in Holstein heifers after superovulation and insemination with sex-sorted semen. *Theriogenology*, 71, 1011-1017.
- Lopes da Costa, L., Chagas e Silva, J. & Robalo Silva, J. (2001). Superovulatory response, embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. *Theriogenology*, 56, 65-77.
- Lubbadech, W.F., Graves, C. N. & Spahr, S. L. (1980). Effect of repeated superovulation on ovulatory response of dairy cows. *Journal of Animal Science*, 50, 124–127.
- Lucy, M.C. (2000). Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *Journal of Dairy Science*, 83, 1635-1647.
- MacFarlane, DR. (1986). Devitrification in glass- forming aqueous solutions. *Cryobiology*, 23, 230-240.
- Macmillan, K.L., (2010). Recent advances in the synchronization of estrus and ovulation in dairy cows. *Journal of Reproduction and Development*, 56, 42-47.
- Makarevich, A.V., Kubovicova, E., Popelkova, M., Fabian, D., Cikos, S., Pivko, J. & Chrenek, P. (2010). Several aspects of animal embryo cryopreservation: anti-freeze protein (AFP) as a potential cryoprotectant. *Zygote*, 18, 145-153.
- Malhi, P.S., Adams, G.P., Mapletoft, R.J. & Singh, J. (2008). Superovulatory response in a bovine model of reproductive aging. *Animal Reproduction Science*, 109, 100 – 109.
- Malhi, P.S., Adams, G.P., Roger, A.P. & Singh, J. (2006). Bovine model of reproductive aging: response to ovarian synchronization and superstimulation. *Theriogenology*, 66, 1257–1266.
- Mapletoft, R.J. (2006). Bovine embryo transfer, *IVIS Reviews in Veterinary Medicine*. Acedido em Jan. 7, 2011 em: <http://www.ivis.org/reviews/rev/mapletoft/chapter.asp?la=1>
- Mapletoft, R.J., Steward, K.B. & Adams, G.P. (2002). Recent advances in the superovulation of cattle. *Reproduction, Nutrition, Development*, 42, 1-11.
- Mapletoft, R.J. & Stookey, J.M. (1998). General sanitary procedures and welfare considerations associated with *in-vivo* production of embryos. In *D.A. Stringfellow & S.M. Seidel (Eds.), Manual of the International Embryo Transfer Society: A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures (3th edition)*. Illinois (USA): IETS. pp. 55-66.
- Massip, A. (2001). Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reproduction in Domestic Animals*, 36, 49-55.
- Massip, A. (1999). Significant steps in cryopreservation of cattle embryos and oocytes. In *Association Europeene de Transfert Embryonnaire, (15th Scientific Meeting)*. Lyon (France): AETE. pp. 16 – 23.
- Massip, A., Zwalmen, V.D.P. & Ectors, F. (1987). Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*, 27, 69-79.

- Monniaux, D., Rico, C., Larroque, H., Dalbiès-tran, R., Médigue, C., Clément, F. & Fabre, S. (2010). L'hormone antimullerienne, prédicteur endocrinnien de la réponse à une stimulation ovarienne chez les bovins. *Gynécologie, Obstétrique & Fertilité*, 38, 465 – 470.
- Mocé, E., Graham, J.K. & Shenk, J.L. (2006). Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. *Theriogenology*, 66, 929-936.
- Moreira, F., Badinga, L., Burnley, C. & Thatcher, W.W. (2002). Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*, 57, 1371-1387.
- Murphy, B.D., Reuben, J., Mapletoft, J., Manns, J. & Humphrey, W.D. (1984). Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology*, 21, 117-125.
- Nasser, L.F., Adams, G.P., Bo, G.A. & Mapletoft, R.J. (1993). Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*, 40, 713-724.
- Nasser, L.F., Reis, E.L., Oliveira, M.A., Bó, G.A. & Baruselli, P.S. (2004). Comparision of four synchronization protocols for fixed-time bovine embryo transfer in *Bos indicus* × *Bos taurus* recipients. *Theriogenology*, 62, 1577-1584.
- Nelson, L.D. & Nelson, C.F. (2001). Handling and culture of bovine embryos: survey of media used by 26 embryo transfer companies in the USA. *Theriogenology*, 56, 1377-1382.
- Nibart, M. & Humblot, P. (1997). Pregnancy rates following direct transfer of glycerol sucrose or ethylene glycol cryopreserved bovine embryos. *Theriogenology*, 47, pp. 371. (abstract).
- Nicholas, F.W. (1996). Genetic improvement through reproductive technology. *Animal Reproduction Science*, 42, 205-214.
- Niemann, H. (1985). Freezing of bovine embryos: effects of a one step addition of 1,4M glycerol. *Theriogenology*, 23, 369-379.
- Niemman, H. (1991). Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology*, 35, 109-124.
- Nienhaus, P., Sacher, B., Smidt, D. & Niemann, H. (1990). Embryo transfer technology as a tool to establish bovine genetic resources. *Theriogenology*, 33,p. 292.
- Nogueira, M.G.F., Melo, D.M., Carvalho, L.M., Fuck, E.J., Trinca, L.A. & Ciro Moraes Barros, C.M. (2004). Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2a and eCG?. *Theriogenology*, 61, 1283-1290.
- O'Shea, T., Hillard, M.A., Anderson, S.T., Bindon, B.M., Findlay, J.K., Tsonis, C.G. & Wilkins, J.F. (1994). Inhibin immunization for increasing ovulation rate and superovulation. *Theriogenology*, 41, 3 – 17.
- Palasz, A.T. & Mapletoft, R.J. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, 14, 127 – 149.
- Peippo, J., Vartia, K., Kananen-Anttila, K., Raty, M., Korhonen, K., Hurmed, T., Myllymaki, H., Sairanen, A. & Maki-Tanila, A. (2009). Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Animal Reproduction Science*, 111, 80-92.

- Pers-Kamezic, E., Warzych, E., Peippo, J. & Lechniak, D. (2010). Growth hormone exerts no effect on the timing of the first zygotic cleavage in cattle. *Theriogenology*, 74, 581-595.
- Plante, C., Bousquet, D., Guay, P. & Goff, A.K. (1987). Luteotrophic activity of bovine embryos. *Theriogenology*, 28, 801-813.
- Prather, R.S., Spire, M.F., Schalles, R.R. (1987). Evaluation of cryopreservation techniques for bovine embryos. *Theriogenology* 28, 195-204.
- Pugh, P.A., Tervit, H.R. & Niemann H. (2000). Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw-dilution, in vitro and in vivo following transfer. *Animal Reproduction Science*, 58, 9-22.
- Ponsart, C., Quinton, H., Rohou, A., Kelhembo, J., Bourgoin, G. & Humblot, P. (2006). Influence of the different time components between flushing and transfer on pregnancy rates of frozen cattle embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 18, 203 – 204.
- Price, C.A., Carrière, P.D., Grosselin, N., Kohram, H. & Guilbault, L.A., (1999). Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle, and consequences for embryo production. *Theriogenology*, 51, 37 – 46.
- Pursley, J.R. & Bello, N.M. (2007). Ovulation synchronization strategies in dairy cattle using PGF_{2α} and GnRH. In *Youngquist, R.S. & Threlfall, W.R., Current Therapy in Large Animal Theriogenology, (2nd edition), USA, Saunders Elsevier, 286-293.*
- Pursley, J.R., Mee, M.O. & Wiltbank, M.C. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF-2α and GnRH. *Theriogenology*, 44, 915-923.
- Putney, D.J., Drost, M. & Thatcher, W.W. (1988 a). Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology*, 30, 195-209.
- Putney, D.J., Drost, M. & Thatcher, W.W. (1989). Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology*, 31, 765-778.
- Putney, D.J., Thatcher, W.W., Drost, M., Wright, J.M. & DeLorenzo, M.A. (1988 b). Influence of environmental temperature or reproductive performance of bovine embryo donors and recipients in the southwest region of the united states. *Theriogenology*, 30, 905-922.
- Rajamahendran, R., Canseco, R.S., Denbow, C.J., Gwazdauskas, F.C. & Vinson, W.E. (1987). Effect of low dose of FSH given at the beginning of the estrous cycle and subsequent superovulatory response in Holstein cows. *Theriogenology*, 28, 59–65.
- Rajamahendran, R. & Calden, M.D. (1993). Superovulatory responses in dairy cows following ovulation of the dominant follicle of the first wave. *Theriogenology*, 40, 99-109.
- Rall, W.F., & Fahy, G. M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature*, 313, 573-575.
- Rathbone, M.J., Kinderb, J.E., Fikec, K., Kojimac, F., Clopton, D., Ogle, C.R. & Bunt, C.R. (2001). Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50, 277–320.
- DeRensis, F. & Scaramuzzi, R.J. (2003). Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - a review. *Theriogenology*, 60, 1139–1151.

- Rico, Ch., Fabre, S., Médigue, C., diClement, N., Clément, F., Bontoux, M., Touzé, J.L., Dupont, M., Briant, E., Rémy, B., Beckers, J.F. & Monniaux D. (2009). Anti-Mullerian Hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biology of Reproduction*, 80, 50-59.
- Rieger, D, Walton, J.S., Goodwin, M.L. & Johnson, W.H. (1991). The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotrophin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. *Theriogenology*, 35, 863-868.
- Rios, G.L., Mucci, N.C., Kaiser, G.G., Alberio, L.H. (2010). Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of *in vitro* produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 118, 19-24.
- Roberge, S., Rieger, D. & Rawlings, N.C. (1995). Periovulatory LH, FSH and steroid hormones profiles in superovulated unstimulated holstein heifers. *Theriogenology*, 44, 59 – 70.
- Roberts, A.J., Grizzle, J.M. & Echterkamp, S.E. (1994). Follicular development and superovulation response in cows administered multiple FSH injections early in the estrous cycle. *Theriogenology*, 42, 917-929.
- Rorie, R.W., Bilby, T.R. & Lester, T.D. (2002). Application of electronic estrus detection technologies to reproductive management of cattle. *Theriogenology*, 57, 137-148.
- Santos, J.E.P., Cerri, R.L.A. & Sartori, R. (2008). Nutricional management of the donor cows. *Theriogenology*, 69, 88 – 97.
- Saragusty, J. & Arav, A. (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141, 1-19.
- Sartori, R., Suarez-Fernandez, C.A., Monson, R.L., Guenther, J.N., Rosa, G.J.M. & Wiltbank, M.C. (2003). Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology*, 60, 1319-1330.
- Saumande, J., Procureur, R. & Chupin, D. (1984). Effect of injection time of anti-PMSG antiserum on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cows. *Theriogenology*, 21, 727-731.
- Sawyer, G.J., Broadbent, P.J. & Dolman, D.F. (1995). Ultrasound-monitored ovarian responses in normal and superovulated cattle given exogenous progesterone at different stages of the oestrous cycle. *Animal Reproduction Science*, 38, 187 – 201.
- Schenk, J.L., Suh, T.K. & Seidel, G.E. Jr. (2006). Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology*, 65, 299 – 307.
- Seidel, Jr. G.E. (1981). Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science*, 211, 351–357.
- Seidel, Jr. G.E. (1984). Applications of embryo transfer and related technologies to cattle. *Journal of Dairy Science*, 67, 2786-2796.
- Seidel, Jr. G.E. (2006). Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*, 65, 228-235.
- Seidel, Jr. G.E. (2007). Overview of sexing sperm. *Theriogenology*, 68, 443-446.
- Seidel, Jr. G.E. & Elsdon, R.P. (1989). Embryo transfer in dairy cattle. *Hoard's Dairyman* . USA. pp. 69-91.

- Seidel, G.E. Jr. & Schenk, J.L. (2008). Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Animal Reproduction Science*, 105, 129 – 138.
- Shea, B.F. (1981). Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology*, 15, 31-42.
- Singh, E.L. (1987). The disease control potential of embryos. *Theriogenology*, 27, 9-20.
- Schmidt, D. & Niemann, H. (1999). Biotechnology in genetics and reproduction. *Livestock Production Science*, 59, 207–221.
- Smith, CH. (1988). Applications of embryo transfer in animal breeding. *Theriogenology*, 29, 203-212.
- Soumano, K., Lussier, J.G. & Price, C.A., (1998). Levels of messenger RNA encoding ovarian receptors for FSH and LH in cattle during superovulation with equine chorionic gonadotrophin versus FSH. *Journal of Endocrinology*, 156, 373 – 378.
- Sreenan, J.M. (1988). Embryo transfer: its uses and recent developments. *Veterinary Record*, 122, 624 – 629.
- Staigmiller, R.B., Bellows, R.A., Anderson, G.B., Seidel, G.E. Jr., Foote, W.D., Menino, A.R.Jr. & Wright, R.H.Jr. (1992). Superovulation in cattle with equine pituitaria extract and porcine FSH. *Theriogenology*, 37, 1091-1099.
- Stringfellow, D.A. (1998). Recommendation for the sanitary handling of in-vivo-derived embryos. In D.A. Stringfellow & S.M. Seidel (Eds.), *Manual of the International Embryo Transfer Society: A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures (3th edition)*. Illinois (USA): IETS. pp. 79-84.
- Stringfellow, D.A. & Givens, M.D. (2000). Preventing disease transmission through the transfer of *in-vivo* derived bovine embryos. *Livestock Production Science*, 62, 237 – 251.
- Stringfellow, D.A. & Seidel S.M. (Eds.). 1990. *Manual of the International Embryo Transfer Society (2nd edition)*. Illinois (USA): IETS. pp.1-89.
- Stringfellow, D.A. & Seidel S.M. (Eds.). 1998. *Manual of the International Embryo Transfer Society: A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures (3th edition)*. Illinois (USA): IETS. pp. 1-170.
- Stroud, B. & Hasler, J.F. (2006). Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. *Theriogenology*, 65, 65-76.
- Thatcher, W.W., Bartol, F.F., Knickerbocker, J.J., Curl, J.S. & Wofenson, D. (1984). Maternal Recognition of pregnancy in cattle. *Journal of Dairy Science*, 67, 2797-2811.
- Thatcher, W.W., Moreira, F., Santos, J.E.P., Mattos, R.C., Lopes, F.L., Pancarci, S.M. & Risco, C.A. (2001). Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*, 55, 75 – 89.
- Thompson, J.G. (1996). Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*, 45, 27–40.
- Tonhati, H., Lôbo, R.B. & Oliveira, H.N. (1999). Repeatability and heritability of response to superovulation in holstein cows. *Theriogenology*, 51, 1151-1156.

- Touati, K., Beckers, J.F. & Ectors, F. (1991). Hormonal control of folliculogenesis in the bovine: better superovulatory responses after pure FSH administration preceding the classical treatment. *Theriogenology*, 35, 285. (abstract).
- Underwood, S.L., Bathgate, R., Ebsworth, M., Maxwell, W.M.C. & Evans, G. (2010). Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed dairy bull sperm. *Animal Reproduction Science*, 118, 7-12.
- Vajta, G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*, 60, 357-364.
- Vajta, G., Holm, P., Greve, T. & Callesen, H. (1997). Comparison of two manipulation methods to produce in vitro fertilized, biopsed and vitrified bovine embryos. *Theriogenology*, 47, 501-509.
- Vajta, G. & Kuwayama, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65, 236 – 244.
- Van de Leemput, E.E., Vos, P.L.A.M., Hyttle, P., Van Der Hurk, R., Bevers, M.M., Van Der Weijden, G.C. & Dieleman, S.J. (2000). Effects of brief postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/prostaglandin-treated heifers. *Theriogenology*, 55, 573 – 592.
- Vasconcelos, J.L.M., Demétrio, D.G.B., Santos, R.M., Chiari, J.R., Rodrigues, C.A. & Sa´ Filho, O.G. (2006). Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cows recipients. *Theriogenology*, 65 192–200.
- Vasconcelos, J.L.M., Silcox, R.W., Rosa, G.J.M., Pursley, J.R. & Wiltbank, MC. (1999). Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 52, 1067-1078.
- Velazquez, M.A., Zaraza, J., Oropeza, A., Webb, R. & Niemann, H., (2009). The role of IGF1 in the *in vivo* production of bovine embryos from superovulated donors. *Reproduction*, 137, 161 – 180.
- Velazquez, M.A., Newman, M., Christie, M.F., Cripps, P.J., Crowe, M.A., Smith, R.F. & Dobson, H. (2005). The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a MOET program. *Theriogenology*, 64, 1977-1994.
- Visintin, J.A. , Martins, J.F.P., Bevilacqua, E.M., Mello, M.R.B., Nicacio, A.C., Assumpção, M.E.O.A. (2002). Cryopreservation of *Bos taurus* VS *Bos indicus* embryos: are they really different? *Theriogenology*, 57, 345-359
- Voelkel, S.A. & Hu, Y.X. (1992). Use of ethylenoglycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-tawed embryos to recipient females. *Theriogenology*, 37, 687-697.
- Vos, P.L.A.M., Bevers, M.M., Willemse, A.H. & Dieleman, S.J. (1995). Does postponement of preovulatory LH surge affect ovulation rate and embryo yield in superovulated Holstein heifers?. *Theriogenology*, 43, pp.344. (abstract).
- Wagtendonk, A.M.L., Daas, J.H.G.D., Kruip, TH.A.M. & Rall, W.F. (1995). Comparison of the efficacy of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos. *Cryobiology*, 32, 157 – 167.

- Walsh, J.H., Mantovani, R., Duby, R.T., Overstrom, E.W., Dobrinsky, J.R., Enright, W.J., Roche, J.F. & Boland, M.P. (1993). The effects of once or twice daily injections of pFSH on superovulatory response in heifers. *Theriogenology*, 40, 313 – 321.
- Weaver, L.D., Galland, J., Sosmik, U. & Cowen, P. (1986). Factors affecting embryo transfer success in recipient. *Journal of Dairy Science*, 69, 2711-2717.
- Webb, R. & Armstrong, D.G. (1998). Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. *Livestock Production Science*, 53, 95-112.
- Wehrman, M.E, Bergfeld, E.G., Cupp, A.S., Kojima, F.N., Peters, K.E., Mariscal, V., Sanchez, T., Kittok, R.J. & Kinder, J.E. (1996). Development of a persistent ovarian follicle influences response to superovulation in cattle. *Theriogenology*, 41, 593-610.
- Woelders, H. & Chaveiro, A. (2004). Theoretical prediction of optimal freezing programmes. *Cryobiology*, 49, 258–271.
- Wolfsdorf, K.E., Diaz, T., Schmitt, E.J.P., Thatcher, M.J., Drost, M. & Thatcher, W.W., (1997). The dominant follicle exerts an interovarian inhibition on FSH-induced follicular development. *Theriogenology*, 48, 435 – 447.
- Woods, E.J., Benson, J.D., Agca, Y. & Critser, J.K. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cell and tissues. *Cryobiology*, 48, 146–156.
- Wrathall, A. & Suttmoller, P. (1998). Potential of embryo transfer to control transmission of disease. In *Stringfellow & S.M. Seidel (Eds.), Manual of the International Embryo Transfer Society: A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures (3th edition). Illinois (USA): IETS. pp. 17-44.*
- Wright, J.M. (1985). Commercial freezing of bovine embryos in embryo straws. *Theriogenology*, 23, 17-29.
- Yamamoto, M., Ooe, M., Kawaguchi, M. & Suzuki, T. (1994). Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology*, 41, 747–755.
- Yavin, S. & Arav, A. (2007). Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*, 67, 81-89.
- Yoshida, C, Yusuf, M. & Nakao, T. (2009). Duration of estrus induced after GnRH-PGF-2 α protocol in dairy heifer. *Animal Science Journal*, 80, 649-654.
- Yu, X.L., Deng, W., Liu, F.J., Li, Y.H., Li, X.X., Zhang, Y.L. & Zan, L.S. (2010) Closed pulled straw vitrification of the *in vitro*-produced and *in vivo*-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 73, 474-479.

6 ANEXOS

6.1 Anexo 1: Exemplos de estádios de desenvolvimento e qualidade de embriões bovinos (extraído de IETS, 1998).

BOVINE EMBRYOS: EXAMPLES OF DEVELOPMENTAL STAGE AND QUALITY



Cycle day: 7
Stage Code: 5
Quality Code: 3
Comments:



Cycle day: 7
Stage Code: 6
Quality Code: 1
Comments:



Cycle day: 7.5
Stage Code: 6
Quality Code: 1
Comments: k



Cycle day: 7.5
Stage Code: 6
Quality Code: 1
Comments: d,k



Cycle day: 7.5
Stage Code: 6
Quality Code: 2
Comments: k



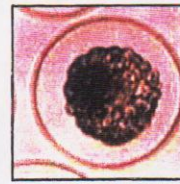
Cycle day: 7.5
Stage Code: 7
Quality Code: 1
Comments:



Cycle day: 7.5
Stage Code: 7
Quality Code: 1
Comments:



Cycle day: 7.5
Stage Code: 7
Quality Code: 1
Comments: j



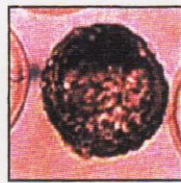
Cycle day: 7.5
Stage Code: 7
Quality Code: 1
Comments: j



Cycle day: 7.5
Stage Code: 7
Quality Code: 2
Comments: j, k



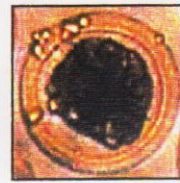
Cycle day: 8.0
Stage Code: 8
Quality Code: 1
Comments: j



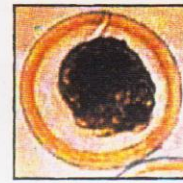
Cycle day: 8.0
Stage Code: 8
Quality Code: 1
Comments: j



Cycle day: 7.0
Stage Code: 4
Quality Code: 2
Comments: l



Cycle day: 7.0
Stage Code: 4
Quality Code: 1
Comments: m



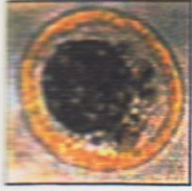
Cycle day: 7.0
Stage Code: 4
Quality Code: 1
Comments: n

Comments:

- d. Single or small blastomeres comprise less than 15% of the total cellular material and the embryo is consistent with the expected stage of development.
- j. Collapsing of the blastocoel is considered a normal physiological process that does not lower the quality code.
- k. Extruded cells in stage code 6, 7 and 8 embryos are often pressed against the zona pellucida and not obvious unless the embryo has collapsed due to normal physiological processes or when a cryoprotective additive is introduced.
- l. This embryo has a flat (even concave) surface of the zona pellucida that can cause the embryo to stick to a petri dish or straw. This defect alone keeps the embryo from being classified as quality code 1 and should not be utilized in international commerce unless agreements allow for other than quality code 1 embryos.
- m. Cellular debris on the surface of the zona pellucida shows that this embryo has not been washed by proper procedures.
- n. This embryo has a cracked zona pellucida at the top of the picture. Embryos that do not have an intact zona pellucida should not be utilized in international commerce.

6.2 Anexo 2: Exemplos de estádios de desenvolvimento e qualidade de embriões bovinos
(extraído de IETS, 1998).

BOVINE EMBRYOS: EXAMPLES OF DEVELOPMENTAL STAGE AND QUALITY



Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 2
Comments:



Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 3
Comments: f, g



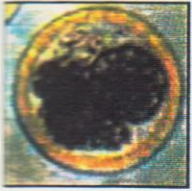
Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 3
Comments: f, g



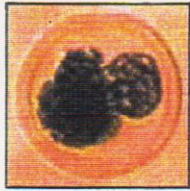
Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 3
Comments: f, g



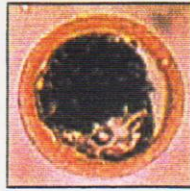
Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 3
Comments: f, g



Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 3
Comments: f, g



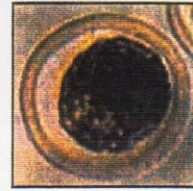
Cycle day: 7
Stage Code: 4
Quality Code: 3
Comments: f, g, h



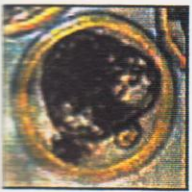
Cycle day: 7
Stage Code: 5
Quality Code: 1
Comments:



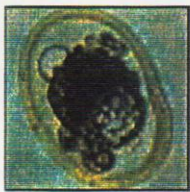
Cycle day: 7
Stage Code: 5
Quality Code: 1
Comments: d



Cycle day: 7
Stage Code: 5
Quality Code: 1
Comments:



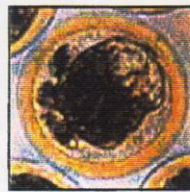
Cycle day: 7
Stage Code: 5
Quality Code: 1
Comments: d, i



Cycle day: 7
Stage Code: 5
Quality Code: 2
Comments: e



Cycle day: 7
Stage Code: 5
Quality Code: 2
Comments:



Cycle day: 7
Stage Code: 5
Quality Code: 2
Comments:






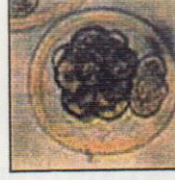











Cycle day: 7
Stage Code: 5
Quality Code: 3
Comments: g

Comments:

- d. Single or small blastomeres comprise less than 15% of the total cellular material and the embryo is consistent with the expected stage of development.
- e. Sperm on zona pellucida.
- f. Embryos with many extruded cells or debris must be carefully rolled over to determine the presence and quality of any viable embryo mass.
- g. Quality code 3 embryos have an embryo mass that is less than 50% of all cellular material within the zona pellucida.
- h. This embryo has a nice but very small mass. If the embryo mass is less than 25% of all cellular material, it should be given quality code 4 (non-viable).
- i. Irregular shape is a common variation in blastocoel development.

6.3 Anexo 3: Exemplos de estádios de desenvolvimento e qualidade de embriões bovinos (extraído de IETS, 1998).

BOVINE EMBRYOS: EXAMPLES OF DEVELOPMENTAL STAGE AND QUALITY

				
Cycle day: 6 Stage Code: 3 Quality Code: 1 Comments: a	Cycle day: 6.5 Stage Code: 3 Quality Code: 1 Comments: a	Cycle day: 6.5 Stage Code: 3 Quality Code: 2 Comments: a, b	Cycle day: 6.5 Stage Code: 3 Quality Code: 2 Comments: a, b	Cycle day: 6.5 Stage Code: 4 Quality Code: 1 Comments: b,c,d
				
Cycle day: 7 Stage Code: 4 Quality Code: 1 Comments:	Cycle day: 7 Stage Code: 4 Quality Code: 1 Comments:	Cycle day: 7 Stage Code: 4 Quality Code: 1 Comments: d	Cycle day: 7 Stage Code: 4 Quality Code: 1 Comments: d	Cycle day: 7 Stage Code: 4 Quality Code: 1 Comments: d
				
Cycle day: 7 Stage Code: 4 Quality Code: 2 Comments: b	Cycle day: 7 Stage Code: 4 Quality Code: 2 Comments: b	Cycle day: 7 Stage Code: 4 Quality Code: 2 Comments: b	Cycle day: 7 Stage Code: 4 Quality Code: 2 Comments: b, e	Cycle day: 7 Stage Code: 4 Quality Code: 2 Comments: b

Comments:

- If this embryo is collected on day 7 or later, the stage is not consistent with the expected stage of development and, therefore, should be lowered one quality code.
- Large cells that were extruded from the embryo mass prior to the 16-cell stage easily make up more than 15% of the total cellular material through stage 5 embryos.
- Large individual blastomeres indicate compaction is not complete and is an early stage 4.
- Single or small extruded blastomeres comprise less than 15% of the total cellular material and the embryo is consistent with the expected stage of development.
- Sperm on zona pellucida.