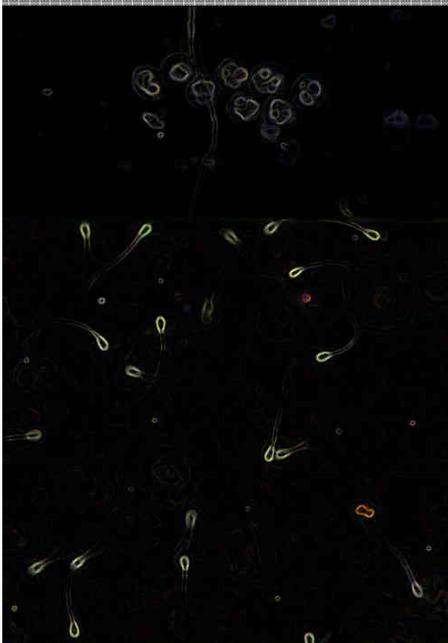


TÉCNICAS AUXILIARES DE REPRODUÇÃO EM BOVINOS



RELATÓRIO DE ESTÁGIO ACESSÓRIO
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA
UNIVERSIDADE DE ÉVORA



GUSTAVO MANUEL QUINTELA PAIXÃO

ÉVORA|²⁰¹⁰



Todas as figuras, gráficos e tabelas sem referência são originais do autor.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Santos de Arguello Diaz, meu orientador científico do estágio, por toda disponibilidade prestada, pelos conhecimentos e experiência transmitidos e sobretudo pela amizade demonstrada.

Ao Dr. Ricardo Romão, meu tutor na Universidade de Évora, pelo apoio e ideias transmitidas.

Ao Professor Ramiro Mascarenhas, sem a sua ajuda, não teria sido possível a realização do estágio.

Ao Dr. Fernando Barquin, pelos conhecimentos, boa disposição e à vontade proporcionados.

Aos médicos veterinários Dr. Nahun, Dr.^a Begoña e Dr. Eugénio, que me acompanharam na maioria das actividades de campo, por toda a paciência, dedicação, sentido pedagógico e sobretudo pela amizade.

Às estagiárias Alba e Sílvia pela simpatia e boa disposição.

Ao Fernando e ao Júlio, pela disponibilidade e colaboração.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. CONSERVAÇÃO DE RAÇAS AUTÓCTONES	2
2.1. TUDANCA	2
2.2. PASIEGA	3
2.3. MONCHINA	4
3. COLHEITA E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÉMEN	6
3.1. COLHEITA	7
3.1.1. VAGINA ARTIFICIAL	7
3.1.2. ELECTROEJACULAÇÃO	8
3.1.3. MASSAGEM TRANSRECTAL	9
3.2. AVALIAÇÃO DE QUALIDADE	10
3.3. PROCESSAMENTO, EMBALAGEM E CONGELAÇÃO	11
4. TRANSFERÊNCIA E CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES	14
4.1. SELECÇÃO DE DADORAS	14
4.2. PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO	15
4.3. COLHEITA	16
4.4. AVALIAÇÃO E PROCESSAMENTO	18
4.5. CONGELAÇÃO	20
4.6. SINCRONIZAÇÃO DE RECEPTORAS E TRANSFERÊNCIA	21
5. CONTROLO REPRODUTIVO E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL	23
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
7. BIBLIOGRAFIA	26

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Cronologia das acções de CCS; descrição, raça e nº de animais sujeitos a CCS; métodos utilizados na colheita; métodos utilizados na congelação e nº total de doses criopreservadas.	7
Tabela 2	Cronologia das acções de colheita de embriões. Descrição da raça dos animais sujeitos a colheita; métodos utilizados na SOV; métodos utilizados na colheita e nº total de embriões fertilizados e óocitos não fertilizados recolhidos, durante o período de estágio.	17
Tabela 3	Classificação segundo a fase de desenvolvimento de embriões, de acordo com a IETS.	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Vacada Tudanca. Pormenor da pelagem dos vitelos Tudancos, típica até os 4 meses de idade	3
Figura 2	Touro Tudanco. Notar o acentuado dimorfismo sexual.	3
Figura 3	Vaca Pasiega em sistema de produção intensivo	4
Figura 4	Vaca e vitelo Monchinos em sistema de semi-liberdade.	4
Figura 5	Colheita de sémen através de vagina artificial.	8
Figura 6	Colheita de sémen por electroejaculação a um touro Tudanco. Pormenor do aparelho Electrojac IV [®] .	9
Figura 7	Laboratório móvel usado na avaliação e processamento de sémen, em acções de CCS <i>ex situ</i>	11
Figura 8	Avaliação da motilidade individual do sémen através de microscopia de contraste (400x).	11
Figura 9	Tanques de azoto liquido usados em CCS <i>ex situ</i> .	12
Figura 10	Esquema do PSC.	16
Figura 11	Esquema do PSM.	16
Figura 12	Colheita de embriões em vaca Pasiega. Lavagem uterina com técnica de gravidade.	18
Figura 13	Colheita de embriões em novilha Holstein-Frisia. Lavagem uterina com técnica de <i>flushing</i> .	18
Figura 14	Mórula compactada (código 4) de má qualidade (3) (10x). Colheita de 23 de Junho a vaca Holstein-Frisia.	20
Figura 15	Blastocisto jovem (código 5) de excelente qualidade (1). O blastocélio é visível (10x). Colheita de 25 de Junho a novilha Holstein-Frisia.	20

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina sérica bovina
CCS	Colheita e criopreservação de sémen
CENSYRA	Centro de <i>Selección y Reproducción</i> Animal
CL	Corpo lúteo
CR	Controlo reprodutivo
FSH	Hormona folículo estimulante
IA	Inseminação artificial
kg	Quilograma
LH	Hormona luteinizante
m	Metro
PBS	Solução salina tomponada com fosfato
PG_{F2α}	Prostaglandina F _{2α}
PREPRAC	Programa de recuperação e preservação de raças autóctones da Cantábria
PSC	Protocolo de superovulação clássico
PSM	Protocolo de superovulação melhorado
SOV	Superovulação
TE	Transferência de embriões

1. INTRODUÇÃO GERAL

O presente relatório refere-se ao estágio curricular, de domínio acessório, na área de produção animal, mais concretamente focado nas técnicas auxiliares de reprodução em bovinos, no âmbito da conclusão do mestrado integrado em medicina veterinária. Este foi realizado no Centro de *Selección y Reproducción Animal* (CENSYRA) de Torrelavega, Santander, Espanha, sob a orientação do Dr. Santos de Argüello Díaz, director do centro. Decorreu no período compreendido entre 1 e 30 de Junho de 2010. O CENSYRA possui um banco de sementais a partir dos quais produz semanalmente doses de sémen congelado para a *Aberekin*, S.A. Este centro também disponibiliza serviços de inseminação artificial (IA) e transferência de embriões (TE). O CENSYRA forma parte integrante do programa de recuperação e preservação de raças autóctones da Cantábria (PREPRAC). É importante referir que o CENSYRA de Torrelavega foi o primeiro Centro de Reprodução em Espanha a realizar transferências embrionárias.

Tendo como ponto de partida os conhecimentos previamente adquiridos nas disciplinas de reprodução animal e ginecologia, obstetrícia e andrologia, o estágio teve como objectivo principal a articulação prática de técnicas auxiliares de reprodução. Foi possível a participação em técnicas de TE, IA, colheita e criopreservação de sémen (CCS), por vagina artificial e electroejaculação. Pela ligação que estas áreas possuem, tive oportunidade de consolidar conhecimentos na área de controlo reprodutivo (CR), através das inúmeras palpações transrectais realizadas, bem como avaliação de reprodutores de aptidão cárneia e leiteira.

2. CONSERVAÇÃO DE RAÇAS AUTÓCTONES

Durante o período de estágio foram várias as acções realizadas no âmbito deste programa. Contudo a actividade resumia-se à CCS e de embriões *ex situ* em animais geneticamente valiosos, com vista à criação de uma banco de material genético. Todas estas actividades foram realizadas “a campo”, com o apoio de unidades móveis equipadas. Na comunidade autónoma da Cantábria existem três raças autóctones de bovinos, todas elas integradas no PREPRAC.

2.1. RAÇA TUDANCA

A raça Tudanca foi aquela com que tive mais contacto e, de certa, forma aquela que mais prazer me deu a trabalhar.

A origem da raça Tudanca remonta ao século XI onde surgem os primeiros documentos fazendo referência a esta raça. Pensa-se ser derivada do grupo das negras ibéricas. Ao longo da história, a Tudanca aparece sempre ligada ao aproveitamento dos *comunales*, pastos comuns de montanha.

É considerada uma raça de tripla aptidão, carne, trabalho e leite, apesar desta última apenas ser suficiente numa produção de subsistência. São animais relativamente pequenos e compactos, com pesos compreendidos entre 400-500 quilogramas (kg) e 1,25-1,30 metros (m) de altura ao garrote. Possuem uma pelagem selvagem, com tonalidades que variam do branco e negro, estabelecendo uma clara diferenciação entre machos e fêmeas, pois os machos, a partir dos 4 meses de idade são praticamente negros, com zonas brancas no dorso e chanfro apresentando também um círculo branco ao redor dos olhos. No aspecto morfológico existe, um acentuado dimorfismo sexual. Enquanto que as fêmeas apresentam pescoços compridos, cabeça comprida e curva e grandes ventres (Figura 1), os machos apresentam um pescoço curto e desenvolvido, um grande peito largo e profundo que termina com uma garupa arqueada e uma cauda de inserção alta (Figura 2).

Em 2008, o seu número situava-se quase nas 13 000 cabeças¹, tendo crescido cerca de 30% numa década. Encontram-se principalmente em zonas mais interiores da comunidade (vales de Saja e Besaya, Lamasón, Liébana, e Campo).



Figura 1

Vacada Tudanca. Pormenor da pelagem dos vitelos Tudancos, típica até os 4 meses de idade



Figura 2

Touro Tudanco. Notar o acentuado dimorfismo sexual.

2.2. RAÇA PASIEGA

A raça Pasiega, também denominada de Roja Pasiega, é autóctone dos Vales Pasiegos, na Cantábria ².

Esta vaca de aptidão leiteira, partilha em muito a história da sua congénere Tudanca, contudo encontra-se numa situação muito mais delicada do ponto de vista de preservação. Esta raça foi durante muito tempo considerada extinta, até que, no ano de 2004, a Consejería de *Desarrollo Rural, Ganadería, Pesca y Biodiversidad* do Governo da Cantábria, encontrou um grupo de vacas que poderiam responder ao padrão da raça clássica. Após a confirmação genética deste padrão racial, iniciou-se um programa de recuperação tendo como base este grupo de vacas.

Em 2008, estavam já registados 397 animais ¹.

É uma raça de pelagem vermelha de tom variável. É um animal relativamente pequeno, com uma altura média de 1,30 m com uma cabeça pequena, frente larga e perfil recto. Tem cornos de tamanho médio, cor creme e pontas negras. As suas extremidades são compridas e finas com articulações robustas e unguilas duras e potentes. Tem um úbere de desenvolvimento médio, com pele fina e untuosa ao tacto (Figura 3). Possui um temperamento desconfiado, mas dócil. A produção de leite média diária, encontra-se actualmente nos 20 litros ³.



Figura 3 | Vaca Pasiega em sistema de produção intensivo.

2.3. RAÇA MONCHINA

Apesar de não ter tido contacto, é importante referir também a raça Monchina. Estes animais são característicos da zona este da Cantábria e País Basco. Típicos de uma produção extensiva de alta montanha, estes animais, mantidos num sistema de semi-liberdade, são conhecidos pela agressividade, tendo sido utilizados ao longo da história como gado de lide (Figura 4).

Apesar de em 2001 estarem apenas registados 1181 animais ⁴, no censo de 2007, contabilizaram-se 1692 cabeças registando um aumento de cerca de 43% ⁵.



Figura 4 | Vaca e vitelo Monchinos em sistema de semi-liberdade.

Durante o período de 2001-2003, uma equipa técnica do CENSYRA desenvolveu um projecto, integrado no PREPRAC, de constituição de um banco de germoplasma das

raças bovinas autóctones da Cantábria Monchina e Tudanca com o objectivo de evitar um possível desaparecimento das mesmas. Este projecto co-financiado pelo *Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria* (INIA) e pela *Diputacion Regional* enquadra-se dentro do projecto a nível mundial realizado pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) cujo objectivo é a preservação da diversidade genética das espécies animais domésticas do mundo, especialmente as bovinas.

Com o surgimento do programa, estes animais voltaram a ser considerados como uma fonte de rendimento. Um subsídio era atribuído aos proprietários consoante o número de doses de sémen e de embriões viáveis que se conseguissem obter. Desta forma, os produtores eram incentivados a manter os seus animais, para além de colaborarem inteiramente nas acções de colheita.

Fruto deste trabalho, em 2003 tinham sido obtidos 140 embriões de vacas Tudancas, um de Monchina, para além de doses de sémen de 25 touros Tudancos e 10 Monchinos⁶.

Este projecto foi continuado e alargado à raça Pasiéga.

Foi no âmbito deste projecto que decorreram as acções de colheita e criopreservação de sémen e embriões *ex situ*.

3. COLHEITA E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÉMEN

As CCS foram actividades enfatizadas durante o período de estágio. Estas actividades foram desenvolvidas no CENSYRA, no âmbito da comercialização para IA de sémen de sementais seleccionados e a campo, aquando de acções integradas no plano de recuperação e preservação das raças autóctones da Cantábria.

Por razões de biossegurança, a CCS de animais não pertencentes ao centro, apenas estavam autorizadas para ser realizadas nas explorações de origem.

O CENSYRA possui um total de 26 sementais em regime de exploração intensiva, estabulados nas instalações do centro, em boxes individuais, sem qualquer acesso a pastoreio e sem contacto físico, visual ou auditivo com fêmeas. Possui animais de aptidão leiteira, de raça Holstein-Friesian e de aptidão cárnea, nomeadamente, Limousine, Blonde d'aquitaine Blanc Bleu Belge, Charoilais.

Por semana são realizadas duas colheitas de sémen, intervaladas em cerca de 15 a 20 minutos, a cada semental. Por uma questão de número e logística, as colheitas são agendadas em dois dias separados por semana. Um dia realizam-se as colheitas dos touros de raça Holstein-Friesian e outro dia as raças de carne.

Durante o período de estágio, tive oportunidade de assistir e participar nestas colheitas semanais.

As CCS no âmbito do PREPRAC eram realizadas nas próprias explorações, em dias previamente acordados com os proprietários, consoante a disponibilidade destes e da equipa. Foram registadas 3 colheitas de sémen a campo, nas explorações de origem, de acordo com a Tabela 1.

Não estava pré-estabelecido o número de colheitas a efectuar por touro, em cada visita. Ou seja, eram realizadas colheitas enquanto os parâmetros de avaliação se mantinham em níveis aceitáveis. A partir do momento em que se começava a obter sémen de baixa concentração e/ou qualidade, as colheitas eram suspensas, podendo ser continuadas noutra dia.

Tabela 1

Cronologia das ações de CCS; descrição, raça e nº de animais sujeitos a CCS; métodos utilizados na colheita; métodos utilizados na congelação e nº total de doses criopreservadas.

Data	Colheita e Criopreservação de Sêmen	Descrição	Nº Animais	Raça	Colheita	Congelação	
					Método	Método	Nº Doses
	07.Jun	CENCYRA	12	Carne	Vagina Artificial	Automático	NC
	08.Jun	PREPAC	1	Pasiega	Electroejaculação	Vapores	347
	10.Jun	CENCYRA	14	Leite	Vagina Artificial	Automático	NC
	18.jun	PREPAC	1	Tudanca	Electroejaculação	Vapores	553
	22.Jun	CENCYRA	12	Carne	Vagina Artificial	Automático	NC
	24.Jun	PREPAC	1	Tudanca	Electroejaculação	Vapores	685

Legenda: NC – não-contabilizado

Ainda durante o período de estágio, tive a oportunidade de acompanhar duas colheitas sêmen realizadas em ursos pardos, no Parque Natural de Cárbaceno.

3.1. COLHEITA

Existem diferentes métodos que podem ser utilizados para a colheita de sêmen bovino nomeadamente a vagina artificial, a massagem transrectal e a electroejaculação ⁷.

3.1.1. VAGINA ARTIFICIAL

O método de eleição para obtenção de sêmen é a utilização de uma vagina artificial, no entanto, para que este método seja exequível, é necessário que os animais sejam treinados para tal.

Este método é utilizado quase exclusivamente em centros de inseminação artificial, como é o caso do CENSYRA. Os componentes normais de uma vagina artificial bovina são uma cobertura rígida, um forro de borracha interior, tiras de borracha para fixar o forro à cobertura, uma válvula, um suporte e um colector de sêmen. Depois de montada a vagina artificial, o espaço entre a cobertura rígida e o forro de borracha é preenchido com água quente. O ideal para os machos é que a água esteja entre os 42 e os 50 °C ⁷, para que seja também compensado o decréscimo de temperatura ao longo do tempo. A pressão, por sua vez, é ajustada adicionando ar através da válvula ao nível da cobertura rígida. É aplicado ainda um lubrificante não-espermicida no interior da vagina artificial, ao nível do forro de borracha.

São necessárias duas pessoas para ser realizada a colheita, uma para conduzir o animal e outra para segurar no suporte contendo a vagina artificial.

Desde que a colheita por este método siga um processo semelhante ao do ambiente e das condições naturais, o touro pode montar uma fêmea em cio, uma fêmea sedada ligeiramente, um manequim ou um outro macho que esteja treinado para o efeito, como no caso do CENSYRA. Quando o animal efectua a monta, o operador encarregue de segurar no suporte com a vagina artificial direcciona o pénis do touro para o interior da mesma e é feita a colheita do sémen que fica retido no colectore (Figura 5.A e B).

Todas as colheitas de sémen realizadas a sementais do CENSYRA foram efectuadas através deste método.



Figura 5 | Colheita de sémen através de vagina artificial.
A. Touro Limousine.
B. Touro Holstein-Friesian.

3.1.2. ELECTROEJACULAÇÃO

A execução desta técnica de colheita de sémen requer a utilização de um electroejaculador, Electrojac[®] IV, no caso das colheitas realizadas durante o período de estágio (Figura 6). Este aparelho é composto por uma sonda que dispõe de uma série de eléctrodos, os quais realizam descargas ao nível dos nervos da porção inferior da bacia do touro. O animal é deste modo estimulado, entrando em erecção, ejaculando em seguida⁸. Na maioria dos touros, a ejaculação ocorre com estímulos eléctricos inferiores a nove voltas⁷.

Os resultados obtidos mediante a colheita por electroejaculação são sempre piores, comparativamente ao uso de vagina artificial, já que o stress induzido ao reprodutor é superior e há maior contaminação do sémen com urina e sujidade ⁶.

Devido ao facto de se tratarem de animais temperamentais, não-treinados, esta técnica foi usada em todas as colheitas realizadas a campo no âmbito do plano de recuperação e preservação das raças autóctones da Cantábria.

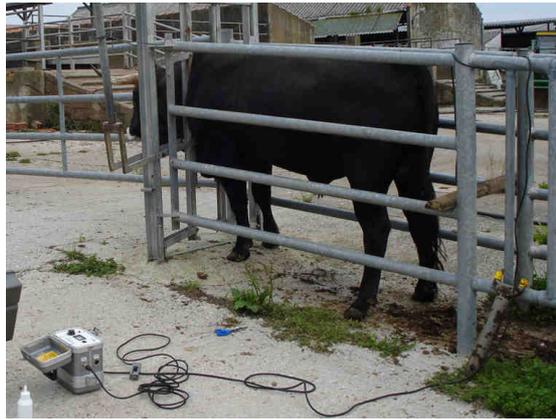


Figura 6 | Colheita de sémen por electroejaculação a um touro Tudanco. Notar o aparelho Electrojac IV[®].

3.1.3. MASSAGEM TRANSRECTAL

Para a execução desta técnica são necessárias duas pessoas, uma para realizar a massagem transrectal e outra para fazer a colheita do sémen. Após a remoção das fezes do recto é aplicada uma vigorosa massagem longitudinal sobre a ampola. Quando o músculo uretral começa a contrair-se, então o operador deve sincronizar a massagem com as contracções do mesmo. De seguida é feita a recolha do sémen num recipiente aquecido.

Trata-se pois de um método menos dispendioso, porém a libido e a erecção são parâmetros que aqui não podem ser avaliados ⁷.

Apesar de aqui referida, esta técnica não foi utilizada em nenhuma das acções de colheita efectuadas.

3.2. AVALIAÇÃO DE QUALIDADE

Após a colheita de sémen era sempre avaliada a qualidade dos ejaculados, no caso das colheitas realizadas a touros do centro, este processo era realizado no laboratório do CENSYRA. Nos exemplares não pertencentes ao centro, o sémen era sujeito a este processo no local de colheita (Figura 7).

A análise da qualidade do sémen divide-se em duas etapas principais: avaliação macroscópica e microscópica.

A avaliação macroscópica, mais simples, realiza-se logo após a colheita do sémen. Desta forma, é avaliado o cheiro, o volume e a cor do ejaculado ⁸.

Na avaliação microscópica são considerados vários parâmetros. A concentração, normalmente o primeiro parâmetro a ser avaliado, foi determinada por espectrofotometria. Trata-se de um método indirecto, que mede a luz monocromática absorvida pelas partículas em suspensão. A densidade óptica da amostra é comparada posteriormente a uma curva standard já validada, permitindo assim saber-se o número de espermatozóides por mililitro de sémen ⁹.

A motilidade massal era determinada após a colocação de uma gota de sémen de aproximadamente 5 milímetros (mm) de diâmetro ou 40 microlitros (μ l) sobre uma lâmina, aquecida a 37°C. Posteriormente efectua-se a observação, com uma ampliação de 40x, e avaliação da motilidade da amostra ⁷. É importante referir que este parâmetro, fundamental nas colheitas de sémen realizadas por vagina artificial, possui utilidade limitada nas colheitas por electroejaculação, devido à baixa concentração dos ejaculados.

Por fim, era avaliada a motilidade individual. Uma gota de sémen fresco ou diluído é colocada entre lâmina e lamela, ambas aquecidas em placa térmica a 37°C. A amostra é observada a microscópio óptico de contraste, numa ampliação entre 200-400x, sendo deste modo determinada a percentagem de espermatozóides com movimentos lineares progressivos ⁷ (Figura 8). Esta análise subjectiva era realizada pelo médico veterinário nas colheitas a campo, enquanto que, no caso das colheitas realizadas no centro, a avaliação da motilidade individual era efectuada pelo Computer Assisted Sémen Analysis (CASA). Este sistema, veio automatizar, simplificar o processo, para além de o tornar mais preciso. De modo geral, o processo baseia-se na captura sucessiva de imagem de espermatozóides em movimento no campo microscópico. Estas imagens são digitalizadas e identificadas as células espermáticas. Procedem-se então ao seguimento destas células em imagens sucessivas, estabelecendo-se trajectórias definitivas. As trajectórias são processadas matematicamente, obtendo-se

resultados numéricos precisos. Os parâmetros determinados para cada espermatozóide são a velocidade do movimento, a trajectória descrita pela cabeça e a frequência com que muda de direcção ⁹.

Igualmente importante na averiguação da qualidade do sémen está a avaliação da morfologia espermática ¹⁰. Na maioria das vezes esta avaliação era realizada no momento em que se observava o sémen para avaliar a motilidade individual, contudo e principalmente nas colheitas realizadas a touros pertencentes ao centro, este procedimento era descurado.

Durante todo este procedimento, o sémen era mantido em banho-maria a 37°C.



Figura 7 | Laboratório móvel usado na avaliação e processamento de sémen, em acções de CCS *ex situ*.



Figura 8 | Avaliação da motilidade individual do sémen através de microscopia de contraste (400x).

3.3. PROCESSAMENTO, EMBALAGEM E CONGELAÇÃO

Se, após a avaliação da qualidade do sémen, os valores mínimos tivessem sido igualados ou superados, este era processado e embalado.

Numa primeira fase, o sémen fresco era diluído para um valor de concentração final de 25×10^6 ou 30×10^6 para raças de carne ou leite, respectivamente. Cada palheta de 0,25 ml, tinha 0,22 ml de volume efectivo, sendo que o cálculo da diluição se efectuava da seguinte forma:

$$[(\text{Concentração Inicial} \times \text{Volume Ejaculado}) / 25] \times 0,22 = \text{Volume Total}$$

Desta forma, era obtido o volume total da diluição. A partir deste valor, era subtraído o volume do ejaculado, obtendo assim o volume de diluidor necessário a adicionar.

Após a diluição, e uma vez já em frascos individuais para cada animal, o sémen era retirado do banho-maria, e então deixado a arrefecer até que igualasse a temperatura ambiente. Após esta descida, o sémen era refrigerado a 3°C, cerca de uma hora para posterior acondicionamento.

A embalagem e impressão eram efectuadas mecanicamente. Uma máquina, introduzia o sémen de forma automática nas mini-palhinhas e gravava a data, o código do centro de onde provêm, o número de registo genealógico do reprodutor, bem como o seu nome e raça. A cor das mini-palhinhas varia consoante a raça do touro. No final deste processo, era realizada a contagem das mini-palhinhas de cada semental. De referir que durante este processo, todo o material é mantido a 3°C.

Uma vez introduzido nas mini-palhinhas, o sémen era submetido ao processo de congelação. Neste ponto é necessário fazer a distinção entre o sémen recolhido no CENSYRA e o sémen recolhido a campo.

Nas congelações realizadas no centro, uma congeladora automática controlada pelo programa informático *IMV Digicool 3T*, era utilizada. Este aparelho permitia o controlo rigoroso da curva de descida da temperatura em função do tempo.

No caso de colheitas efectuadas nas explorações de origem, e na ausência de uma congeladora automática, a congelação foi realizada através de uma técnica antiga, contudo eficaz, denominada congelação por vapores. As mini-palhinhas de sémen agrupadas em suportes são colocadas num recipiente fechado com algum azoto líquido. É importante que o nível do azoto líquido seja ligeiramente inferior ao nível onde se situam as mini-palhinhas, de forma não existir qualquer contacto. O sémen permanecia no interior durante 10 minutos.

Uma vez concluída a congelação, todas as doses processadas eram armazenadas em tanques de azoto líquido a -196°C (Figura 9).



Figura 9 | Tanques de azoto liquido usados em CCS *ex situ*.

Cerca de 72 horas após a congelação, era efectuada a reavaliação de qualidade do sémen. Esta é uma etapa fundamental, uma vez que a congelação é um procedimento crítico na CCS. Assim sendo, só depois da reavaliação do sémen após descongelação, é possível quantificar os espermatozóides que resistiram a este procedimento.

A sobrevivência depois da criopreservação de muitos tipos de células, incluindo os espermatozóides, está bastante dependente da taxa de congelação e descongelação, e especialmente da temperatura à qual as células são refrigeradas antes da sua introdução em azoto líquido ¹¹.

O procedimento para a reavaliação do sémen após congelação é semelhante ao processo de avaliação de qualidade do sémen (ver ponto 2.2. Avaliação de Qualidade). Por norma, o sémen era aprovado a partir de uma percentagem de espermatozóides com motilidade individual progressiva de 45-50%.

É importante realçar que os valores dos parâmetros de avaliação de qualidade obtidos a partir do sémen de touros de raças autóctones eram, em grande parte dos casos, inferiores aos dos animais residentes no CENSYRA. Apesar deste sémen ser obtido por electroejaculação, e consequentemente ser de menor qualidade, acresce o facto que animais nunca foram sujeitos a qualquer selecção genética direccionada no âmbito da qualidade espermática. Desta forma, e sobretudo neste animais, é fundamental a reavaliação do sémen, afim de seleccionar animais capazes de integrar o PREPRAC.

4. TRANSFERÊNCIA E CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES

A TE é uma biotecnologia que permite recolher embriões de uma fêmea dadora e transferi-los para fêmeas receptoras com a finalidade de completarem o período de gestação. Apesar dos procedimentos sofisticados necessários para sua implementação, a TE é uma técnica mundialmente difundida ¹². A importância fundamental para a produção animal consiste na possibilidade de uma fêmea produzir um número de descendentes muito superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva ¹³. Para o melhoramento zootécnico, torna-se um instrumento importante, pois vai acelerar e conferir maior precisão ao processo de selecção animal.

Além disto, a TE pode ser utilizada na obtenção de descendentes de animais com distúrbios reprodutivos geneticamente superiores, impedindo, em alguns casos, o seu refugio ¹².

4.1. SELECÇÃO DE DADORAS

Existem vários factores que afectam os resultados reprodutivos e genéticos da TE. A dadora pode ser considerada um factor importante, influenciando todo o processo. O estado sanitário da dadora bem como o da exploração proveniente, a selecção genética, factores individuais, como os critérios reprodutivos, são alguns dos parâmetros que se assumem preponderantes nesta técnica ¹⁴.

O intervalo parto-superovulação deve ser ponderado e adaptado consoante o nível de produção e de condição corporal das dadoras. Da mesma forma, a dieta neste período deve ser ajustada a estes factores. Uma dieta com excessos ou défices em energia, proteína, vitaminas e minerais deve ser evitada. Acima de tudo, é necessário ter em consideração que estes ajustes não devem ser nenhuma forma bruscos, tentando evitar quaisquer situações que provoquem stress para a dadora ¹⁴.

Ao transferir embriões de animais não avaliados geneticamente podemos estar a aumentar a frequência de genes menos desejáveis. Utilizar estes animais sistematicamente, vai aumentar os níveis de endogamia na população, prejudicando toda a vantagem do aumento das taxas de evolução genética. Desta forma, é necessária uma avaliação cuidadosa do material genético a ser utilizado.

4.2. PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO

A superovulação (SOV) é um dos elementos chaves na biotecnologia de embriões. Desta forma, o sucesso da TE está directamente relacionado com o número e a qualidade dos embriões obtidos na colheita ¹⁵.

O princípio fisiológico do SOV tem por base a existência de uma grande quantidade de folículos primordiais no ovário. Durante cada ciclo éstrico, apenas um dos folículos se torna dominante e completa o seu desenvolvimento. Os tratamentos de SOV têm como objectivo contrariar este facto, ou seja, pretende-se o desenvolvimento completo e ovulação de todos os folículos pré-antrais que iniciaram este processo num determinado ciclo éstrico. Assim, o tratamento SOV deve ser realizado no começo de uma onda folicular, antes da selecção do folículo dominante, para se obter a melhor resposta possível e desejável ¹².

A variação da resposta ao tratamento de SOV está relacionada com diversos factores, entre os quais a hormona gonadotrófica utilizada, a dose aplicada, a duração do tratamento, o dia do ciclo éstrico em que se inicia o tratamento, a idade, o estado nutricional, a raça, a estação do ano ⁶.

Nos tratamentos de SOV acompanhados durante o estágio, foram usadas duas hormonas gonadotróficas de origem suína, Folltropin[®] (700 U.I. de FSH) constituído por hormona folículo estimulante (FSH) purificada contendo alguma hormona luteinizante (LH) vestigial e Pluset[®], com uma relação 1:1 entre FSH e LH (500 U.I. FSH e 500 U.I. de LH).

Foram utilizados dois protocolos de SOV distintos: o protocolo de superovulação clássico (PSC) (Figura 10) e o protocolo de superovulação melhorado (PSM) ¹⁴(Figura 11). A diferença entre estes dois programas centra-se na dinâmica folicular. Desta forma, o PSC estabelece um início de tratamento com hormonal a termo fixo, 8-10 dias após o cio, partindo do princípio que o animal terá apenas duas ondas foliculares, e que estas evolucionarão dentro do padrão normal.

Por outro lado, o PSM garante que o tratamento com FSH será iniciado no começo de uma onda folicular, garantindo desta forma, um desenvolvimento uniforme de todos os folículos, e excluindo a possibilidade de já existir um folículo dominante. Além deste facto, a vantagem de utilizar dispositivos intra-vaginais ou implantes auriculares para a sincronização do estro de doadoras, consiste na possibilidade do tratamento SOV ser iniciado independentemente da fase do ciclo estral ¹⁶.

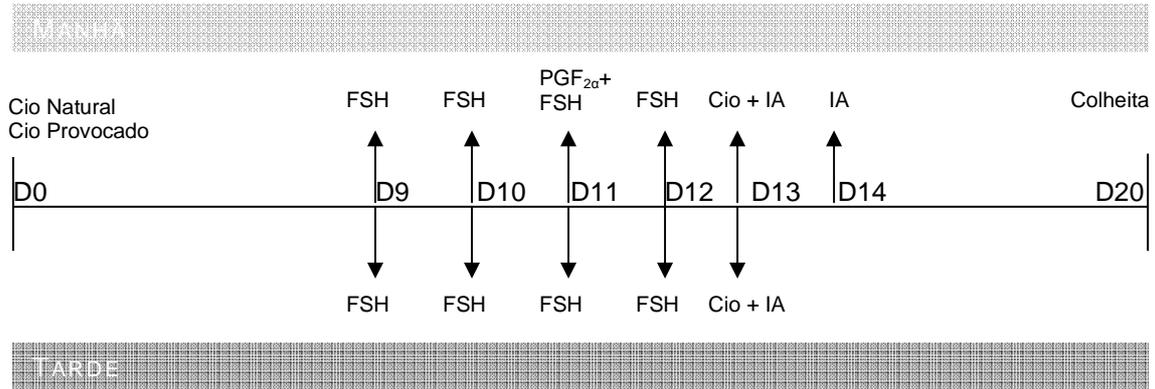


Figura 10 | Esquema do PSC.

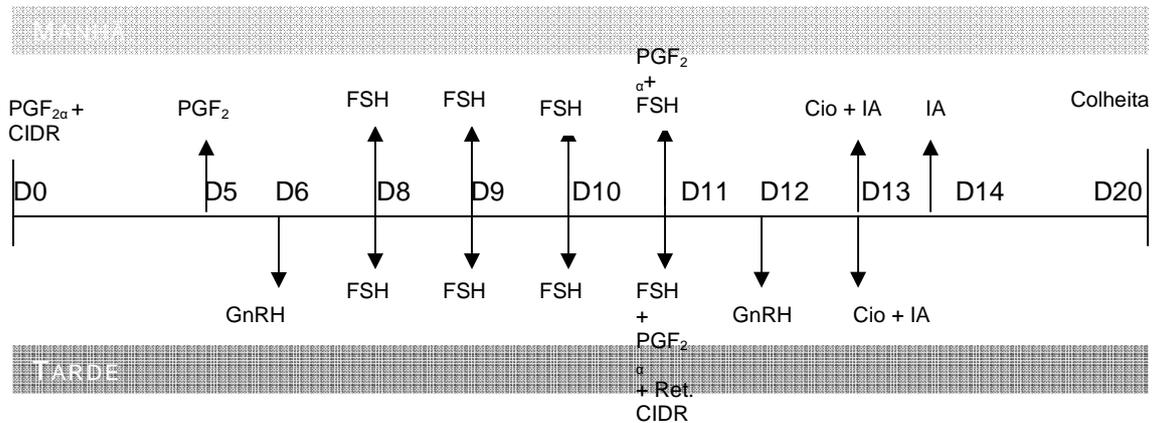


Figura 11 | Esquema do PSM.

4.3. COLHEITA

Uma palpação transrectal era realizada para detectar a presença das estruturas no ovário, nomeadamente de vários corpos lúteos (CL). Em caso de resposta positiva, efectua-se uma anestesia epidural baixa com 5 ml de lidocaína a 2%. O tempo médio necessário para a colheita de embriões é de 20 minutos, sendo igualmente importante conter a doadora.

A colheita de embriões é realizada preferencialmente, entre o sexto e oitavo dia após a primeira inseminação das dadoras¹⁷. Neste período o embrião encontra-se flutuando no lúmen da extremidade dos cornos uterinos. Isso permite a sua captação através da técnica de lavagem dos cornos uterinos¹⁷.

A colheita, com o animal em estação, é realizada pelo método transcervical com o auxílio de um cateter de borracha de *Foley* ou de plástico flexível contendo um balão

insuflável na sua extremidade distal. Inicialmente, com o auxílio de um mandril de metal no seu lúmen para o tornar rígido, este cateter é introduzido e posicionado num dos cornos uterinos. Posteriormente, o balão é cheio com 10 a 20 ml de ar sendo retirado o mandril do interior do cateter. É importante salientar que todo este procedimento é auxiliado por palpação transrectal.

A partir deste ponto, procede-se à lavagem uterina, propriamente dita, com uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) aquecida e filtragem do lavado, num circuito fechado. Na Tabela 2 estão representados dois métodos de lavagem efectuados.

Tabela 2 | Cronologia das acções de colheita de embriões. Descrição da raça dos animais sujeitos a colheita; métodos utilizados na SOV; métodos utilizados na colheita e nº total de embriões fertilizados e oócitos não fertilizados recolhidos, durante o período de estágio.

	Colheita de Embriões	Raça	Superovulação	Colheita		Resultado	
			Método	Método	Data	Embriões	Oócitos
Dadora	Vaca	Pasiega	PSC	Gravidade	03.Jun	0	0
	Novilha	Blonde d'equitaine	PSC	Gravidade	14.Jun	0	1
	Vaca	Pasiega	PSC	Gravidade	16.Jun	0	5
	Vaca	Pasiega	PSC	Gravidade	16.Jun	4	0
	Vaca	Holstein-Frisia	PSM	<i>Flushing</i>	23.Jun	1	8
	Novilha	Holstein-Frisia	PSM	<i>Flushing</i>	25.Jun	7	0

A principal diferença destes métodos encontra-se na maneira de instilação do meio no corno uterino. Assim, no método de gravidade, o meio PBS encontra-se suspenso acima do nível do animal. Este encontra-se ligado ao cateter de Folley por um sistema em “V”. Desta união sairá a ligação por onde o meio retornará e será filtrado. Desta forma, para além do operador necessitar de suspender o meio PBS, ainda terá de massajar o corno uterino corresponde, pois a entrada do meio PBS, a baixa pressão, não permite uma correcta lavagem uterina (Figura 12).

Por outro lado, no método *flushing*, o meio PBS é instilado sob pressão através de uma seringa, sendo que, desta forma, o operador não necessitará de massajar o corno uterino (Figura 13).

Até ao momento posterior de avaliação e processamento, o liquido colhido deve ser mantido à temperatura ambiente, evitando oscilações de temperatura que podem influenciar negativamente sobre a vitalidade dos embriões ¹².



Figura 12 | Colheita de embriões em vaca Pasiega. Lavagem uterina com técnica de gravidade.

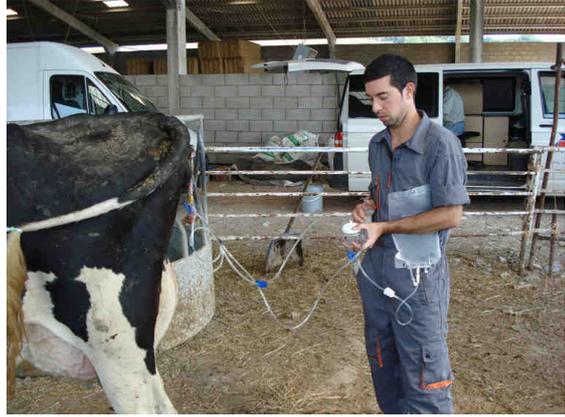


Figura 13 | Colheita de embriões em novilha Holstein-Friesian. Lavagem uterina com técnica de *flushing*.

4.4. AVALIAÇÃO E PROCESSAMENTO

Depois de realizada a colheita, o filtrado, depois de colocado em placas de Petri raiadas com 12 cm de diâmetro, era observado à lupa com um aumento de 10x. Após a localização de possíveis embriões viáveis, estes eram transferidos para um meio de PBS + 0,4% de albumina sérica bovina (BSA), designado comumente de meio de conservação e transferência. Neste ponto, era efectuada a sua valoração segundo a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS).

Segundo este sistema, os embriões eram seleccionados de acordo com a sua fase de desenvolvimento. A idade do embrião é estabelecida a partir do dia do estro (dia 0). São utilizados oito códigos correspondentes aos estágios de desenvolvimento, como se pode observar na Tabela 3. Desta forma, apenas eram seleccionados as mórulas compactadas (Figura 14), os jovens blastocistos (Figura 15) e os blastocistos.

Tabela 3 | Classificação segundo a fase de desenvolvimento de embriões, de acordo com a IETS. Adaptado de ¹⁴.

Código	Estado	Características	Dias
1	Não fertilizado	Não há divisão celular.	
2	2-12 células	2-12 blastômeros diferenciados.	2-4
3	Mórula	Aglomerado celular; blastômeros individuais podem ser distinguidos na sua superfície.	5-6
4	Mórula compacta	Blastômeros individuais não podem ser distinguidos na superfície do embrião.	6-7
5	Blastocisto jovem	Uma pequena cavidade, o blastocélio, é visível. A massa celular interna começa a formar-se.	7
6	Blastocisto	O embrião ocupa a maior parte da zona pelúcida, a massa celular interna tornar-se mais distinta mas o diâmetro global do embrião, incluindo a zona pelúcida, permanece inalterado.	7-8
7	Blastocisto expandido	O diâmetro embrionário está aumentado e a espessura da zona pelúcida pode estar reduzida para aproximadamente 1/3 da espessura original.	8
8	Blastocisto eclodido	O embrião está completamente livre da zona pelúcida; é nítida a presença da fase de blastocélio.	8-10

De seguida, os embriões eram avaliados morfológicamente, segundo a classificação IETS, considerando a relação entre estruturas e qualidade dos seguintes parâmetros: esfericidade e integridade da zona pelúcida, uniformidade da membrana celular; opacidade, simetria, compactação e integridade dos blastômeros; integridade e ausência de fragmentos celulares na zona pelúcida; proporcionalidade entre o embrião e o espaço perivitelino ¹⁸.

Segundo esta classificação qualitativa, os embriões eram classificados como excelente (1), bom (2), regular/mau (3) e morto (4), sendo que apenas os pertencentes aos dois primeiros grupos estão aptos para congelar.

A classificação de embriões deve ser realizada criteriosamente para garantir boas taxas de concepção, e com isto aumentar a eficiência reprodutiva.

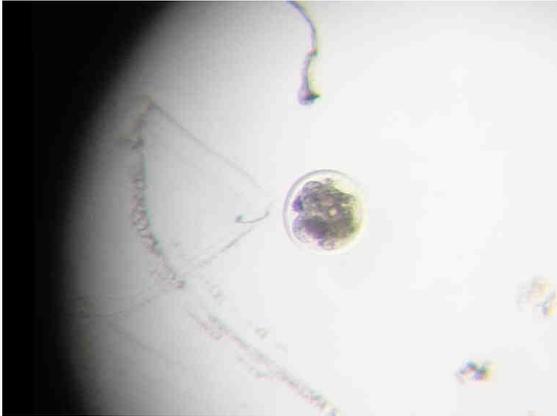


Figura 14 | Mórula compactada (código 4) de má qualidade (3) (10x). Colheita de 23 de Junho a vaca Holstein-Friesian.



Figura 15 | Blastocisto jovem (código 5) de excelente qualidade (1). O blastocélio é visível (10x). Colheita de 25 de Junho a novilha Holstein-Friesian.

Uma vez seleccionados, os embriões eram sujeitos a um procedimento de lavagem, onde eram transferidos entre 10 poços com meio de PBS + 0,4% BSA + tripsina 0,25%. Após este ponto, o embrião está pronto a ser transferido em fresco.

4.5. CONGELAÇÃO

Tal como acontece no processo de criopreservação de sémen, a congelação é uma etapa crítica, tendo em conta que infere directamente na viabilidade dos embriões.

As problemáticas principais surgem com o risco de concentração de solutos e formação de gelo intracelular.

A solução destes problemas passa pela utilização de crioprotectores, como o glicerol ou etilenoglicol, protegendo o embrião da concentração de solutos. Através de uma descida lenta da temperatura no processo de congelação, a água intracelular presente nas células embrionárias, tem oportunidade de sair para o espaço extracelular por osmose, evitando a formação de gelo intracelular ¹⁴.

Inicialmente, o embrião é transferido para um meio de congelação. De seguida, era colocado nas mini-palhinhas 0,25 ml segundo o modo: meio de congelação – bolha de ar – meio de congelação + embrião – bolha de ar – meio de congelação.

Após a identificação das mini-palhinhas, estas eram introduzidas no congelador automático que replicava a curva de congelação pretendida. Esta curva tinha como característica, a manutenção a -6,5°C durante cerca de 15 minutos, temperatura à qual se dá a cristalização, sendo que após esta temperatura, a descida procedia-se a

uma velocidade controlada de 0,5°C/min até atingir os -35 °C, onde posteriormente era introduzida em azoto líquido a -196°C.

Como meio de congelação usamos o etilenoglicol, visto que permite uma transferência directa no momento da descongelação.

4.6. SINCRONIZAÇÃO DE RECEPTORAS E TRANSFERÊNCIA

As receptoras também participam do processo da TE na medida em que o estado sanitário destas e da sua exploração, bem como a correcta sincronização e selecção são indispensáveis para o desenrolar de todo o procedimento.

Podemos dividir os métodos de sincronização de receptoras em dois grupos. Os métodos tradicionais: detecção natural de cio e TE ao 7º dia; cio induzido através do uso de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) observação do cio e TE ao 7º dia e cio induzido com uso de dispositivos de libertação lenta de progesterona, combinados com $PGF_{2\alpha}$. Estes métodos necessitam de observação do cio, o que por vezes, dificulta o processo. Através dos métodos de sincronização tradicionais, aproximadamente 50% das receptoras com cio observado não são seleccionadas para TE:

O método reset, por sua vez, permite constituir lotes grandes de receptoras, não se torna necessária a detecção de cios e apresenta uma grande eficácia na utilização das receptoras para a TE ¹⁴. Contudo, este método não é exequível na União Europeia já que envolve a utilização de β -Estradiol.

A transferência propriamente dita, assemelha-se um pouco ao processo de IA, no entanto, neste caso, o embrião é colocado no corno ipsilateral ao corpo lúteo, o mais profundo possível.

Ao contrário do que acontece na IA, a contaminação uterina é um problema a considerar na transferência, já que nesse momento o útero está mais susceptível devido aos altos níveis séricos de progesterona, o que não ocorre no momento da IA, aquando do predomínio do estradiol. Desta forma, transferências mais demoradas e com maior dificuldade de manipulação possuem um risco de contaminação uterina maior, o que pode contribuir para reduzir a taxa de gestação.

Um dos problemas relatados após a transferência é a luteólise. Existem várias estratégias para evitar estes problemas: Aumentar o tamanho do folículo pré-ovulatório para obter CL grandes que produzam mais progesterona, aumentar as concentrações de progesterona, diminuir o efeito do folículo dominante no período crítico e evitar a produção de $PGF_{2\alpha}$ ¹⁴. Duas destas estratégias foram utilizadas em algumas TE no decorrer do estágio. A utilização do dispositivo de libertação lenta de progesterona

PRID aumentou as concentrações de progesterona. Por fim era efectuada a administração de flunixinina meglumina 1,1 mg/kg peso vivo (PV) intra-muscular (IM) no momento da transferência, afim de minimizar a libertação de $\text{PGF}_{2\alpha}$, resultante da manipulação uterina.

.

Tendo em vista a prática da técnica de colheita, realizei a sondagem de várias vacas, no matadouro, o que me permitiu ter oportunidade de realizar algumas colheitas.

Ainda durante o período de estágio, tive a oportunidade de acompanhar duas colheitas de embriões em éguas.

.

5. CONTROLO REPRODUTIVO E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Durante o período de estágio tive oportunidade de contactar com duas realidades bastante diferentes relativamente ao CR de bovinos. No que diz respeito às explorações de bovinos de leite assistidas, existem planos de CR bem definidos, contrastando com a maioria das explorações de bovinos de carne. Nestas últimas, o controlo reprodutivo resumia-se normalmente ao diagnóstico de gestação (DG).

O CR realizado nas explorações de bovinos leiteiros é fundamental para a manutenção e melhoria da fertilidade do efectivo e, portanto, para a rentabilidade da exploração. Cabe ao médico veterinário a sensibilização do produtor para a importância da implementação e manutenção de um sistema de CR do efectivo, afim da maximização do potencial produtivo e económico da exploração, sendo sua responsabilidade, executá-lo de uma forma adequada.

De um modo geral, o plano de acompanhamento reprodutivo baseava-se em vários exames ginecológicos.

O exame das vacas no pós-parto realizava-se entre os 21 e os 30 dias pós-parto tendo como objectivos a avaliação do estado de involução uterina (avaliação da simetria, tamanho e tonicidade dos cornos e corpo uterinos), a existência de actividade ovárica e lesões palpáveis no tracto reprodutivo. Diversas doenças são frequentemente detectadas aquando da realização deste exame, tais como metrite, piómetra, aderências uterinas e ováricas ou abscessos uterinos. Nestes casos, era determinada e aplicada a terapêutica mais adequada a cada situação.

O DG, normalmente realizado 45-60 dias após IA nas explorações leiteiras, era realizado a todos os animais, em diferentes fases de gestação, nas explorações de aptidão carne. Embora o diagnóstico de gestação por palpação transrectal possa ser realizado a partir dos 30 dias de gestação, de um modo geral este apenas era realizado a partir dos 40 dias. Este exame tem como principal objectivo a identificação de vacas não gestantes. Em muitos casos, a partir dos 90 dias de IA era realizada a confirmação de gestação em animais positivos ao primeiro DG.

Durante o período de estágio deparei-me ainda com alguns animais com historial de infertilidade ou sub-fertilidade. A partir do exame ginecológico, exame de estado geral e história pregressa, era sugerido um diagnóstico através do qual se ponderavam as possíveis soluções para estas vacas-problema.

Relativamente às IA, e pela experiência que adquiri ao longo do estágio, é sem dúvida alguma uma técnica banalizada e comumente usada na maioria das explorações bovinas da Cantábria.

É importante salientar que ambas as actividades surgiram no seguimento das acções de TE ou CSS. O médico veterinário, uma vez na exploração, procedia ao CR ou IA, tanto no âmbito do programa de TE, como em outros animais isolados. Por esta razão não quantifiquei o número de animais sujeitos a CR, no entanto realizei largas dezenas de palpações transrectais que me permitiram adquirir uma maior prática no DG por palpação transrectal, ou identificação de situações patológicas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a realização do estágio e término do presente relatório posso concluir que os objectivos previamente definidos foram totalmente alcançados. Este estágio contribuiu para o meu enriquecimento do ponto de vista académico e pessoal.

O acompanhamento da actividade dos profissionais do CENSYRA permitiram-me, por um lado, desenvolver a capacidade de aplicação prática dos conhecimentos teóricos adquiridos durante o percurso académico e, por outro lado, adquirir novos conhecimentos teórico-práticos na área de técnicas auxiliares de reprodução.

Em relação às actividades apresentadas, observou-se uma maioria na espécie bovina, no entanto, verificaram-se actividades noutras espécies, tais como, equinos e ursos.

As técnicas auxiliares de reprodução adquirem, cada vez mais, uma maior dimensão permitindo contornar as questões mais complicadas inerentes à monta natural, nomeadamente permitem a concentração da época de partos, controlo das doenças sexualmente transmissíveis, aceleração da selecção genética, entre outros aspectos.

A aposta na criação de um banco de germoplasma das raças autóctones da região da Cantábria revelou-se um projecto que deixa transparecer a preocupação com a manutenção da biodiversidade. Ultrapassados por raças ou cruzamentos de raças mais produtivas, estes animais de elevada rusticidade necessitam de programas de recuperação e preservação adequados à sua situação particular.

Parece-me óbvio que estes animais, mesmo após longo trabalho de selecção genética, nunca chegarão a parâmetros produtivos próximos das actuais raças melhoradas. Contudo, penso que a conservação de um determinado património genético e consequentemente número de animais é fundamental, não só de uma forma romântica, embelezando a paisagem e as suas gentes, fortalecendo o turismo, mas também de um ponto de vista funcional, podendo ser usada em cruzamentos com raças melhoradas de forma a otimizar a adaptação do animal ao ambiente.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Donante E. Las cabezas de ganado tudanco crecieron un 30% en diez años. *El Dáριο Mantañes*. 2010.
2. Rio JP. La vaca pasiega autóctona será incluida en el Catálogo Oficial de Razas. *El Dáριο Mantañes*. 2007.
3. Rio JP. Cantabria cuenta con 344 vacas pasiegas. *El Dáριο Mantañes*. 2007.
4. Eurocarne. Los censos de raza monchina y limousina, los que más han crecido desde el 2000 en Cantabria. *InfoCarne.com*. 2009.
5. Rio JP. Aumenta el censo de las razas autóctonas tudanca y monchina. *El Dáριο Mantañes*. 2007.
6. Garcia MJC. Informe Final del Proyecto: Conservación “ex situ”, Mediante la Utilización de Técnicas de Reproducción Animal Asistida, y Tipificación Genética de las Razas Bovinas Tudanca e Monchina en Cantábria. 2005.
7. Baracaldo MI, Barth AD, Bertrand W. Steps For Freezing Bovine Semen: From Semen Collection to The Liquid Nitrogen Tank. *IVIS*. 2006.
8. Whittier WD, Bailey T. Predicting Bull Fertility. *Veterinary Medicine*. 2000;9-12.
9. Ordoñez COH, Miguel CT, Monforte CD. Análisis del Sémén Bovino. *Boletín informativo del SERIDA*. 2005;2:39-43.
10. Youngquist RS, Threlfall WR. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2nd ed: Saunders Elsevier; 2007.
11. Robles VMM, Carvajal ES, Santamaria YMV, Casallas PEC. Crioconservación de Semen Bovino Usando un Congelador Programable (CL-8800) y Determinación de Su Calidad Postdescongelación por Mediou n Sistema de Análisis Espermático Asistido. *Universidad de los Llanos*. 2007.
12. Gonçalves PBF, Figueiredo JR, Freitas VJ. *Bioteχνicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo2001.

13. Taneja M, Bols PEJ, Velde V. Development competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal, variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biology Reproduction, Champaing*. 2000;31.
14. Fuentes SI. Manual de Transplante de Embriones en Ganado Vacuno. *Aberekin S. A*. 2002.
15. Rumpf R. Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e equina. *Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*. 2005.
16. Andrade JCO, Oliveira MAL, Lima PF. Use steroid hormone treatments prior to superovulation in Nelore donors. *Animal Reproduction Science*. 2002;69.
17. Demétrio DGB. *Colheita e transferência de embriões bovinos*. São paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP; 2003.
18. Goodhand KL, Watt RG, Staines ME. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*. 1999;51:951-961.