



COLETA E CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES: RELATO DE CASO EM BOVINO

KANITZ, Franciele¹; DAMIANI, Juliane; MORGÃO, Gabriela; BORGES, Luiz Felipe².

Palavras-chave: Superovulação. Transferência. Protocolo.

INTRODUÇÃO

A técnica de transferência de embriões vem sendo usada há um século, sendo primeiramente descrita em coelhos em 1890, e em 1951 em bovinos, segundo Ball (2006). Para Gonçalves (2014) essa técnica permite recolher embriões de uma fêmea doadora e transferi-los para fêmeas receptoras com a finalidade de complementarem o período de gestação. Ball (2006) ainda complementa que a principal razão para a técnica foi promover o aumento no progresso genético, podendo criar grandes famílias de irmãos contemporâneos. Já para Gonçalves (2014), a técnica permite a fêmea de alto valor genético produzir um número de descendentes muito superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva.

A criopreservação consiste no congelamento do produto final da coleta, sendo para Hafez (1993), uma maneira para centros de criação animal manterem maior gama de estoques, armazenando-os quando não estiverem em uso imediato, economizando espaço e dinheiro e permitindo proteção.

Este trabalho tem como objetivo relatar o processo de coleta, seguido de congelamento em uma fêmea bovina.

METODOLOGIA

No dia 23 de março de 2015, em uma propriedade particular situada em Pinheirinho, localidade de Ibirubá-RS, foi dado início ao protocolo de superovulação em uma vaca da raça Polled Hereford, com 17 anos de idade. O protocolo utilizado iniciou com a implantação de pessário de progesterona, mais 2 mL de Benzoato de Estradiol no dia 0. No dia 4, quando inicia o crescimento da onda folicular, houve a administração exógena do hormônio FSH, que

¹ Acadêmicas do curso de Medicina Veterinária da Universidade de Cruz Alta – UNICRUZ. E-mail: fkanitz@hotmail.com

² Professora do curso de Medicina Veterinária, responsável pela disciplina de Metodologia da Pesquisa da Unicruz, Cruz Alta.



segundo Ball (2006) tem atividade do hormônio estimulante de folículos, o qual supera os mecanismos naturais que normalmente permitiriam que um folículo se torne dominante e ovule. Neste protocolo, foi utilizado Folltropin-V, que é um extrato de FSH altamente purificado de glândulas pituitárias suínas, com LH desprezível. Este foi utilizado 3,5 mL as 7 horas e as 19 horas do dia 4. Repetindo no dia 5, com 2,5 mL as 7 horas e as 19 horas. No dia 6 foram aplicados 1,5 ml as 7 horas e as 19 horas. E por fim, no dia 7, aplicados 0,5 mL as 7 horas e as 19 horas. Ainda no dia 7, foi aplicado um agente luteolítico (prostaglandina), juntamente com a retirada do pêsário de progesterona.

Com a lise do corpo lúteo, causado pela aplicação da prostaglandina, juntamente com a retirada do progesterona, a vaca entrou em estro no dia 8, vindo a ser inseminada com sêmen de touro Polled Hereford de boa qualidade, previamente analisado, 12 horas após a demonstração de estro, juntamente com aplicação exógeno de GnRH, sendo novamente inseminada 24 horas após a demonstração de estro.

A coleta dos embriões ocorreu no dia 15 do protocolo, no sétimo dia após fecundação, esperando-se encontrar embriões em estágios de mórula ou blastocisto. Com a vaca contida no tronco de contenção, foi dado o início da coleta fazendo anestesia epidural para relaxamento do útero. Em seguida, pela palpação retal a cérvix foi localizada, e o cateter de Foley de três vias estéril foi introduzido via intravaginal, no primeiro corno uterino a ser lavado. Este cateter é composto de um manguito que é inflado, mantendo o mesmo no local e evitando o vazamento do meio. Logo acima do manguito, há duas perfurações que são as entradas para o meio de lavagem com pH neutro e para os embriões lavados. Mais na extremidade, há uma perfuração, na qual se dá a passagem do meio de lavagem para o útero. Na direção oposta do manguito, há duas válvulas. Em uma se dá a entrada de ar para inflar o manguito, e na outra, a entrada do meio de lavagem. Entre essas duas válvulas, há uma ligação com o copo coletor com filtro. O procedimento foi repetido no outro corno uterino. O copo coletor foi lavado, e seu conteúdo colocado em uma placa de Petri para análise em lupa, onde foram identificados sete embriões, sendo destes, quatro viáveis. Três deles estavam em estágio de mórula, e um em estágio de blastocisto.

Após a identificação, estes embriões foram aspirados e lavados em seis poços de etileno glicol e após colocados em meio *Holding* para manutenção. Então foram envasados em palhetas de 0,25 mL, sendo então submetidos a criopreservação, onde foram congelados em equipamento próprio para o procedimento, em uma curva contínua com diminuição de 0,5°C/minuto, e então estocados em butijão de nitrogênio a -196°C.



RESULTADOS E DISCUSSÕES

A principal vantagem da criopreservação de embriões em relação a de sêmen ou de oócitos é que o embrião contém o genoma completo, segundo Hafez (1993). Porém, para Moreno et al. (2004), a variabilidade da resposta ao tratamento superovulatório ainda é limitação para a técnica, mas pode ser controlada levando em consideração os conhecimentos da função ovariana. Ainda defende que em bovinos, recentes protocolos para o controle da dinâmica folicular e luteínica permitem iniciar o tratamento superovulatório em momento predeterminado. A superovulação, segundo Gonçalves (2014), pode ser definida como resultado do tratamento hormonal de estimulação do desenvolvimento tautócrano de diversos folículos terciários até o estágio de pré-ovulação, com subseqüentes ovulações múltiplas. Para ele, o tratamento objetiva suprir a deficiência de concentração de FSH antes que o folículo dominante promova a redução da concentração endógena dessa gonodotrofina.

Ball (2006) defende que a técnica de transferência de embriões é bem vinda para fazer o melhor uso do potencial da doadora, defendendo ser normal superovular a vaca para que vários embriões possam ser coletados dela em cada lavagem. Já Palma (1993) cita que o objetivo da transferência de embriões é obter a partir de progenitores de alto mérito genético, o maior número possível de descendentes utilizando o útero de receptoras de menor valor econômico para levar a gestação até o fim, Ainda defende que apesar de que se cumpra todos os requisitos, a resposta superovulatória é muito variável sendo essa variando conforme a doadora e seu meio ambiente. Segundo Hafez (1993), a resposta superovulatória diminui com os tratamentos sucessivos, sendo menores a partir do quinto tratamento. Palma (1993) também defende que os tratamentos devem ser separados por um período de no mínimo 60 dias, tempo necessário para os folículos primários alcançar o estado preovulatório.

A criopreservação é a técnica onde o embrião se mantém conservado em Nitrogênio, propiciando a viabilidade dos mesmos por um longo período, segundo Gonçalves (2014). Porém, Hafez (1993) cita que os embriões podem ser danificados durante a criopreservação e/ou descongelamento, podendo ser por formação de cristais de gelo intracelular, causando a desidratação das células. Segundo Palma (1993), esses cristais lesionam os blastômeros. Hafez (1993) ainda defende que o congelamento lento evita a formação de cristais, mas eleva os danos por efeitos de solução. As faixas mais críticas de temperatura são de -4°C a -60°C . Portanto se faz necessário a seleção morfológica dos embriões, visando identificar aqueles que potencialmente deverão sobreviver aos processos de congelamento e descongelamento, segundo Gonçalves (2014). Hafez (1993) complementa ao citar que os embriões selecionados devem ser da melhor qualidade e estar no estágio correto da clivagem.



CONCLUSÃO

Apesar dos avanços biotecnológicos, as respostas continuam individuais, sendo cada animal respondendo aos protocolos de maneiras distintas. Tendo como fator limitante o domínio da técnica, custo e intenso manejo dos animais.

Referências bibliográficas:

BALL, P. J. H; **Reprodução em Bovinos**; São Paulo, 2006.

GONÇALVES, Paulo Bayard Dias et al; **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**; São Paulo, 2014.

HAFEZ, E.S.E; **Reproduction in Farm Animals**; Malvern, 1993.

MORENO, D. et al; **Manipulação Hormonal do Ciclo Estral em Doadoras e Receptoras de Embrião Bovino**; Acta Scientiae Veterinariae, 32; p. 1-22.

PALMA, Gustavo A.; BREM, Gottfried; **Transferência de Embriones Y Biotecnologia de La Reproduccion en la Especie Bovina**. Buenos Aires, 1993.