

AVALIAÇÃO DA TAXA DE PRENHEZ DE EMBRIÕES POBRES PRODUZIDOS *IN VIVO* SUBMETIDOS A CULTIVO PRÉ TRANSFERÊNCIA

Ana Paula da Silva¹; Adiel Cristiano Nino² Ana Lúcia Martins Bonotto³;
Fernanda Rosa⁴.

Resumo: Um dos fatores mais importantes associados ao sucesso da disseminação da aplicação da TE é a avaliação dos embriões antes de criopreservação e/ou transferência para receptoras, pois existe uma relação entre as características morfológicas e estruturais e a capacidade de desenvolvimento dos embriões, com isso objetivou-se avaliar embriões de baixa qualidade, sua taxa de crescimento em cultivo, e diferença na taxa de prenhez em inovulações únicas e inovulações duplas. Os embriões usados foram aqueles que apresentavam baixa qualidade, que foram submetidos a um cultivo e acompanhado seu desenvolvimento. Os embriões que se desenvolveram foram transferidos para receptoras e de acordo com a disponibilidade, e em algumas, foram inovulados dois embriões, sendo assim as inovulações foram divididas em dois grupos, grupo I: inovulação única e grupo II: inovulação dupla. Do total de 127 embriões submetidos a cultivo, 71 (55,9%) foram inovulados, destes diagnosticou-se 36 prenhezes, 50,70%. No grupo I realizaram-se 48 inovulações, obtendo-se 20 prenhezes (41,66%), no grupo II foram realizadas 23 inovulações onde se confirmou 16 prenhezes (69,57%) observando-se uma taxa de prenhez maior quando inovulados dois embriões juntos. O aproveitamento de embriões de qualidade inferior mantidos em cultivo se mostrou uma alternativa viável, pois obteve-se uma boa taxa de crescimento assim como uma boa taxa de prenhez. As inovulações duplas também podem ser uma alternativa viável, pois incrementam significativamente na taxa de prenhez.

Palavras chave: Transferência de embriões; qualidade embrionária; aproveitamento de embriões.

¹Ana Paula da Silva – Acadêmica de medicina veterinária UCEFF-Itapiranga-SC.
anapaulasilva-2015@hotmail.com

² Adiel Cristiano Nino- Médico – Médico Veterinário autônomo – Palmitinho-RS

³ Ana Lúcia Martins Bonotto – Médica Veterinária autônoma – Santiago-RS

⁴ Fernanda de Souza Rosa – Docente do curso de Medicina veterinária da UCEFF- Itapiranga-SC.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos líderes no mercado mundial de exportação de carne bovina, e encontra-se em lugar de destaque no desenvolvimento científico e na aplicação comercial de biotecnologias da reprodução. A correta utilização destas biotecnologias nas propriedades rurais traz como benefício o aumento da produtividade que em fazendas de corte e leite está diretamente vinculada à eficiência reprodutiva do rebanho (BARUSELLI et al., 2016).

A baixa eficiência reprodutiva do rebanho nacional ainda é fator limitante para o crescimento sustentável da pecuária de corte e de leite. Prova disso é que o Brasil possui cerca de 80,6 milhões de fêmeas em idade reprodutiva e produz apenas 55,2 milhões de bezerros por ano (ANUALPEC, 2015).

Assim, o aprimoramento e a crescente aplicação das biotecnologias ligadas à reprodução animal, como a transferência de embriões (TE) e a fertilização *in vitro* (FIV), contribuem para o aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos bovinos (SCANAVEZ et al., 2013). A TE em bovinos é utilizada atualmente para o melhoramento genético com a utilização de vacas comprovadas, inseminadas com sêmen de touros comprovados, embora um pequeno número de descendentes são produzidos anualmente, seu impacto é grande devido à qualidade dos animais produzidos (MAPLETOFT, 2013).

É possível perceber que o mercado de embriões produzidos *in vivo*, tem espaço e potencial para crescer, pois mercado existe e assim o aprimoramento das técnicas, o conhecimento das respostas biológicas e a interação desses fatores deve ganhar atenção dentre as pesquisas na tentativa de tornar mais eficiente a produção *in vivo* de embriões (SPIES, 2016).

Um dos fatores mais importantes associados ao sucesso da disseminação da aplicação da TE é a avaliação dos embriões antes de criopreservação e/ou transferência para receptoras, a melhor forma de prever a viabilidade embrionária é identificar o estágio de desenvolvimento compatível com o que deveria se encontrar no dia de análise pós-ovulação (BÓ; MAPLETOFT, 2013). De acordo com a classificação da IETS, (1998) os embriões são classificados quanto ao grau de qualidade de 1 (excelente ou bom) a 4 (morto

ou de baixa qualidade), sendo indicados somente a transferência de embriões classificados de 1 a 3.

De acordo com Gonçalves et al., (2008), existe uma relação entre as características morfológicas e estruturais de embriões bovinos de diferentes qualidades e capacidade de desenvolvimento de embriões após transferência, e por isso, propõe que uma forma de aumentar a capacidade de desenvolvimento de embriões parcialmente degenerados à colheita é cultivá-los por 24 a 48h em condições de laboratório antes de transferi-los.

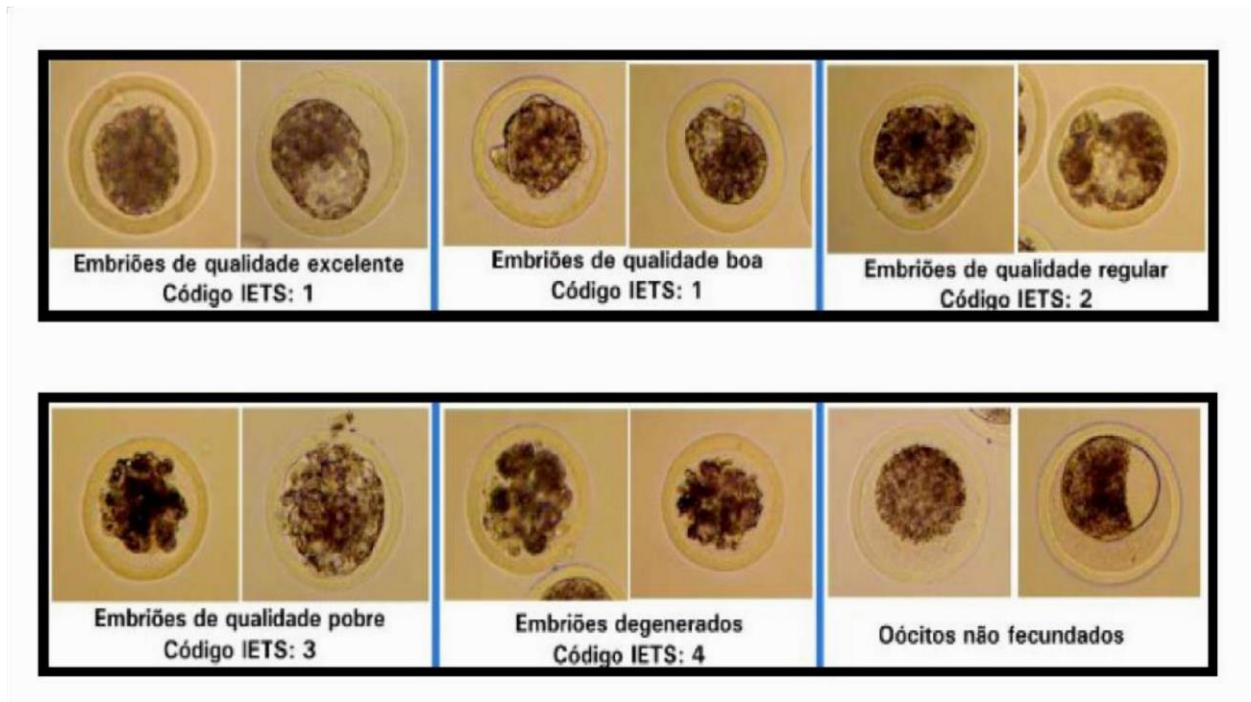
Com isso, objetivou-se avaliar embriões de baixa qualidade, mantidos em condições de laboratório, sua taxa de crescimento em cultivo, e diferença na taxa de prenhez em inovulações únicas e inovulações duplas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisados os dados das coletas e transferências de embriões (TE) bovinos no período de 2002 a 2017 na Central ABN - Agropecuária localizada em Santiago-RS, todas executadas pelo mesmo técnico. As vacas receptoras de embriões eram da raça Angus e mestiças, mantidas em sistema extensivo de criação com pasto nativo, suplementação mineral e água *ad libitum*.

Os embriões transferidos eram coletados de vacas da própria propriedade, que foram transferidos pós-coleta (á fresco). Os embriões usados neste estudo foram aqueles que apresentavam baixa qualidade, pobres (IETS, 1998; Figura 1), que foram submetidos a um cultivo em um meio enriquecido (Holding Plus®, vitrocult) sobre a mesa aquecedora a temperatura de 36° C e acompanhado seu desenvolvimento durante algumas horas (2 a 12 horas).

Figura 1: Qualidade morfológica dos embriões bovinos segundo o código da IETS. FONTE: IETS, 1998.



Os embriões que se desenvolveram foram transferidos para receptoras e de acordo com a disponibilidade, e em algumas, foram inovulados dois embriões, sendo assim as inovulações foram divididas em dois grupos, grupo I: inovulação única e grupo II: inovulação dupla.

A transferência era realizada sete dias após a detecção do estro das receptoras (figura 2). A detecção de estro foi realizada durante uma hora duas vezes ao dia (manhã e tarde) por profissionais treinados e no momento da TE as receptoras eram examinadas a fim de identificar se estavam aptas a transferência e o local de deposição do embrião. Aproximadamente 50 dias após a TE foi realizado o diagnóstico de gestação com auxílio de ultrassonografia para avaliação da taxa de prenhez (porcentagem de vacas prenhes em relação ao total de inovulações).

Figura 2: Esquema representativo das ações realizadas nas receptoras de embriões.



RESULTADOS E DISCUSSÕES

Do total de 127 embriões submetidos a cultivo, 71 (55,9%) foram inovulados (Tabela 1). Do total de inovulações (71), diagnosticou-se 36 prenhez (50,70%) (Tabela 2), observando-se uma boa taxa de prenhez para embriões de baixa qualidade.

Tabela 1. Resultados obtidos com os embriões colocados para cultivo, total de embriões que se desenvolveram e não se desenvolveram.

Embriões colocados para cultivo	Nº de embriões	%
Embriões que se desenvolveram	71	55,9
Embriões que não se desenvolveram	56	44,1
Total	127	100

Tabela 2. Taxa de prenhez dos embriões inovulados, total de receptoras prenhes e vazias.

Diagnóstico	Nº de Receptoras	Taxa de prenhez
Prenhes	36	50,7%
Vazias	35	49,3%
Total	71	100%

No grupo I realizaram-se 48 inovulações, obtendo-se 20 prenhez (41,66%), no grupo II foram realizadas 23 inovulações onde se confirmou 16 prenhez (69,57%), (Tabela 3), observando-se uma taxa de prenhez maior quando inovulados dois embriões juntos.

Tabela 3. Taxa de prenhez obtida no grupo I e grupo II.

Inovulações	Nº de embriões	Prenhes (%)	Vazias (%)
Grupo I	48	20 (41,66)	28 (58,33)
Grupo II	23	16 (69,57)	7 (30,43)
TOTAL	71	100%	100%

De acordo com o manual da IETS (1998), é indicado somente a inovulação de embriões excelentes, bons ou regulares, não sendo indicado o uso de embriões pobres e parcialmente degenerados, pois embriões pobres demonstram prenhez inferior aos embriões regulares ou excelente e bons (35,2 vs. 53,8 e 59,4%, respectivamente) (CHEBEL et al., 2008).

Porém com o resultado apresentado neste estudo, a utilização de cultivo é uma alternativa para o aproveitamento destes embriões mais fracos, pois se ele se desenvolve em um meio pobre (*holding* e temperatura 36° C), ele terá capacidade de se desenvolver no ambiente uterino que é mais propício.

Segundo Brauner et al., (2015), o grau de qualidade dos embriões afeta a taxa de prenhez, em estudo realizado com vacas *Bos taurus*, obtiveram resultados para taxa de prenhez de 58%, 56% e 44% para embriões excelentes, bons e regulares respectivamente. Neste estudo, observamos uma média de 50,70% de prenhez com embriões pobres mantidos em cultivo, o que se aproxima da prenhez dos embriões regulares (CHEBEL et al., 2008; BRAUNER et al., 2015) e é superior a prenhez dos embriões pobres (CHEBEL et al., 2008).

Em estudo com vacas leiteiras, Ferreira (2008) avaliou a adição de antioxidante ao meio de manutenção (*holding*) de embriões bovinos produzidos *in vivo* sobre a taxa de

concepção, porém não obteve incremento das taxas de concepção comparado com embriões que permaneceram apenas no meio de manutenção sem o antioxidante. Isso demonstra também que a manutenção dos embriões no cultivo com ou sem aditivos não altera a prenhez, então os embriões que se desenvolveram no cultivo, tem capacidade de se desenvolver no útero.

A qualidade dos embriões está relacionada com aspectos morfológicos e número de células viáveis, sendo que, embrião excelente/bom, regular, ou ruim, possui em torno de 85%, 50% e 25% de células viáveis respectivamente (ROBERTSON & NELSON, 2008) (Tabela 4). Isso explica a baixa prenhez encontrada em embriões pobres em outros estudos (CHEBEL et al., 2008), porém se selecionarmos apenas os embriões que se desenvolvem no cultivo pós coleta, podemos incrementar a taxa de prenhez destes embriões.

Tabela 4. Critérios para avaliação de embriões bovinos segundo os parâmetros de qualidade propostos pela IETS. FONTE: IETS 1998.

Avaliação	Principais características morfológicas
Excelente ou bom	Estágio de desenvolvimento corresponde ao esperado; massa embrionária simétrica e esférica com blastômeros individuais que são uniformes em tamanho, cor e densidade; forma regular, a ZP não deve apresentar superfície côncava ou plana, deve ser lisa e, preferencialmente intacta; menos de 15% de células extrusadas.
Regular	Estágio de desenvolvimento corresponde ao esperado; forma regular, ZP intacta ou não, irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho; pelo menos de 50% das células compõem massa embrionária viável; menos de 15% de células extrusadas.
Pobre	Estágio de desenvolvimento não corresponde ao esperado; irregularidades maiores na forma geral da massa embrionária ou no tamanho; menos de 75% das células degeneradas; pelo menos 25% das células compõem massa embrionária viável.

Morto ou degenerado

Estágio de desenvolvimento não corresponde ao esperado, embrião em degeneração; massa embrionária de menos de 25% de todo material celular presente no interior da ZP.

Mesmo isolando a prenhez de embriões pobres do grupo I (41,66%), onde foram transferidos apenas um embrião por receptora, observamos um incremento na taxa de prenhez comparado aos embriões pobres transferidos sem cultivo (35,2%; Chebel et al., 2008).

Já a maior prenhez encontrada nas inovulações duplas do grupo II (69,57 vs. 41,66%) neste estudo provavelmente se deve ao fato de que com a presença de dois embriões se tem uma maior produção de interferon (ITF-) e assim uma melhor sinalização da gestação, já que esse fator parácrino produzido pelo blastocisto em expansão atua no útero prevenindo a síntese de $\text{PGF2}\alpha$ pelo endométrio evitando a luteólise (PFEIFER & FERREIRA, 2017) e este fenômeno está positivamente associado com a sua máxima produção de IFN- bloqueando a luteólise (DESTRO, 2014).

Porém uma desvantagem da transferência dupla de embriões para a mesma receptora seria a possibilidade do desenvolvimento dos dois embriões, o que acarretaria em risco de freemartismo, bem como distocias e problemas puerperais.

Além da qualidade embrionária existem outros fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões, como a sincronia entre receptora e embrião e o tamanho do corpo lúteo (CL) (NETO et al., 2014). A qualidade do CL está diretamente relacionada a sua capacidade de produção de progesterona, existe correlação direta entre as concentrações plasmáticas de progesterona e a sobrevivência embrionária pois o ambiente materno é indispensável ao desenvolvimento embrionário e a progesterona é responsável por estimular a produção das proteínas do leite uterino (PFEIFER & FERREIRA, 2017). Para este estudo, todas as receptoras passavam por exame antes das transferências para avaliação da presença e qualidade do CL.

Um fator limitante da biotécnica de transferência de embriões é a manutenção de grande número de receptoras por doadora, com isso, busca-se aumentar o aproveitamento da maioria das receptoras, para diminuir os custos fixos de manutenção de animais que não são aproveitados (FUCK et al., 2002). Pode-se notar que, a maioria dos embriões

colocados para cultivo se desenvolveu (55,9%) conforme demonstrado na Tabela 1, e nas inovulações os resultados foram bons, com 50,70% de prenhez, como observado na tabela 2. Sendo assim o cultivo dos embriões pobres antes da TE, representa uma boa alternativa para otimização das receptoras, pois se transfere apenas os embriões vivos.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o aproveitamento de embriões de qualidade inferior mantidos em cultivo se mostrou uma alternativa viável, pois obteve-se uma boa taxa de crescimento assim como uma boa taxa de prenhez. As inovulações duplas também podem ser uma alternativa viável, pois incrementam significativamente na taxa de prenhez. Com isso a utilização de cultivo para embriões pobres é uma alternativa para aproveitamento dos mesmos bem como diminuição dos custos com receptoras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: AgraFNP, 2015. 407p.

BARUSELLI, P. S. et al. **Situação atual, desafios e perspectivas da reprodução programada em bovinos de corte e de leite**. Biotecnologia da Reprodução em Bovinos, anais do 7º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. LondrinaPR, 2016.

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

BRAUNER, C.C; et al. **Efeito da sincronia do estro entre receptoras e doadoras de embriões, qualidade e estado (congelado ou fresco) do embrião sobre a taxa de prenhez em transferência de embriões**, Resumos XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Gramado, 2015.

CHEBEL, R.C; DEMÉTRIO, D.G.B.; METZGER, J. **Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds.** Theriogenology, v.69, n.1, p. 98-106, 2008.

DESTRO, F.C; et al. **Role of interferon-tau in the maternal recognition of pregnancy.** CES Medicina Veterinária y Zootecnia v.9, n.2, p.338-347, 2014.

FERREIRA, R.M. **Efeito da adição de antioxidante (trolox®) ao meio de manutenção de embriões bovinos produzidos in vivo e ao meio de transporte de oócitos bovinos aspirados de ovários provenientes de abatedouro.** Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho, Jaboticabal, 2008.

FUCK, E.J; et al. **Uso de gonadotrofina equina em receptoras de embriões para avaliar o incremento da progesterona endógena no dia da inovulação e sua correlação com a taxa de prenhez.** Acta Scientiarum, v. 24, n. 4, p. 1119-1126, Maringá, 2002.

GONÇALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. **Transferência e criopreservação de embriões bovinos**, p. 201239. 2ª edição, São Paulo, Editora ROCA, 2008.

IETS. Manual da sociedade internacional de transferência de embriões, **Certificação e identificação de embriões**, p.109-123, 3ª Edição, Copyright, 1998.

MAPLETOFT, R.J. **History and perspectives on bovine embryo transfer**, Animal Reproduction, v.10, n.3, p.168-173, 2013.

NETO, V.H.F; et al. **Parâmetros que afetam a taxa de prenhez de receptoras bovinas de embriões produzidos in vitro.** Medicina Veterinária ISSN 1809-4678, Recife, PE, 2014.

PFEIFER, L.F.M.; FERREIRA, R. Ginecologia e ultrassonografia reprodutiva em bovinos; **Fisiologia do desenvolvimento embrionário e fetal**, p. 49-64, 2ª Edição, Brasília-DF, Embrapa, 2017.

Robertson & Nelson. Título *In*: IETS. Manual da sociedade internacional de transferência de embriões, **Certificação e identificação de embriões**, p.109-123, 3ª Edição, Copyright, 1998.

SCANAVEZ, A.L; CAMPOS, C. C; SANTOS, R. M. **Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro***. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.64, n.3, p. 722-728, 2013.

SPIES, C. **Produção embrionária, perfil endócrino, metabólico e molecular de vacas holandesas não lactantes recebendo dieta à base de milho ou poupa cítrica**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba- SP- 2016.