

COMPARAÇÃO DA TAXA DE PRENHEZ CONFORME O ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* E TRANSFERIDOS EM BOVINOS DE CORTE E LEITE

Suélen Laube Pacheco¹; Angelo Rumpf Hoppen²; Fernanda de Souza Rosa³

Resumo: É constante o crescimento do uso das biotecnologias reprodutivas de produção de embriões nos rebanhos bovinos para se ter ganho genético em curto período de tempo. Dentre estas biotecnologias, a PIV ganha bastante destaque, porém as taxas de prenhez na TE podem variar de acordo com o estágio de desenvolvimento e qualidade dos embriões, sincronia entre embriões, doadoras e receptoras e qualidade de corpo lúteo. Por tanto objetiva-se com o presente estudo comparar o estágio de maturação dos embriões de bovinos de leite e corte com os resultados das taxas de prenhez. Foram realizadas 475 transferências de embriões no período de um ano (julho/2016 a julho/2017) em 4 propriedades distintas, sendo 2 de bovinos de corte e 2 de leite. Os oócitos foram aspirados das doadoras pela técnica de punção ovariana guiada por ultrassonografia em intervalos de 20 dias e, posteriormente, encaminhados para a PIV onde era realizado a maturação, fertilização, cultivo, clivagem e envase dos embriões aos 7 dias para serem transferidos em estágios de mórula (Mo), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx). Já as receptoras eram avaliadas pelas condições do trato reprodutivo e presença de corpo lúteo, sendo posteriormente, feita a transferência e diagnóstico de gestação aos 60 dias. Dos embriões transferidos, 251 foram de raça de corte e 224 de leite, demonstrando taxa de prenhez de 41,4% e 34,4%, respectivamente. Observou-se diferença na taxa de prenhez quanto ao estágio de desenvolvimento, sendo maior para embriões no estágio de Bx (51% nas raças de corte e 43% nas raças de leite) e menor para os estágios de Mo (34% nos bovinos de corte) e Bi (23,5% nos bovinos de leite). A melhor taxa de prenhez de embriões no estágio de Bx é atribuída ao adiantamento e maior atividade do embrião aos 7 dias de cultivo em comparação aos demais, o que favorece sua sobrevivência pós-transferência. Assim, conclui-se que os estágios de desenvolvimento dos embriões interferem na taxa de prenhez dos bovinos, independente da raça.

¹ Médica Veterinária pela UCEFF Itapiranga, Itapiranga - SC. E-mail: suelenlpacheco@hotmail.com

² Médico Veterinário Laboratório de Reprodução Animal Araucária, Pato Branco - PR.

³ Médica Veterinária professora do curso de Medicina Veterinária, UCEFF Itapiranga, Itapiranga - SC. Email: fernandarosa@uceff.edu.br

Palavras-chave: desenvolvimento embrionário; transferência de embriões; biotecnologias reprodutivas.

Introdução

O aumento da produção da pecuária brasileira está relacionado com o uso das várias biotecnologias reprodutivas que vem sendo desenvolvidas e aprimoradas com o objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva dos animais de boa genética, aumentando assim, o número de descendentes em um curto período de tempo (HONORATO et al., 2013; SILVA et al., 2015).

Dentre várias biotecnologias reprodutivas, destaca-se a produção de embriões *in vitro* (PIV) que consiste em manipular o espermatozoide e o oócito de forma laboratorial, para a formação de um novo indivíduo, semelhante ao que ocorre fisiologicamente na fêmea (Scanavez et al., 2013), na qual os oócitos são maturados e fecundados para posterior cultivo os zigotos e estruturas embrionárias até a transferência dos embriões (TE) (MELLO et al., 2016a).

Além de produzir embriões viáveis de alto valor genético em um curto período de tempo, a PIV também é uma boa alternativa às fêmeas que não estão mais aptas a produzirem descendentes convencionalmente. Pode ser usada como doadoras de oócitos fêmeas que tenham a partir de 6 meses de idade, gestantes até o terceiro mês ou no período pós-parto (MELLO et al., 2016b).

O sucesso da técnica de TE produzidos *in vitro* ainda é um dos grandes empecilhos, visto que sua eficiência ainda é relativamente baixa. Dos oócitos coletados de bovinos, apenas 35-40% que passam pelos estágios de MIV, FIV e CIV, chegam ao estágio de blastocisto e destes, somente 40% chegam ao término do processo para a realização da TE às receptoras (GOTTARDI & MINGOTI, 2009; PEREIRA et al., 2010).

O estágio de desenvolvimento e qualidade dos embriões, sincronia entre embriões, doadoras e receptoras e qualidade de corpo lúteo são aspectos importantes dentro de um programa de TE, influenciando diretamente a taxa de prenhez (VELOSO NETO et al., 2014).

A mortalidade dos embriões é proveniente de vários possíveis motivos, entre eles, os fatores intrínsecos dentro do embrião, falha de comunicação entre o embrião e a mãe, falha da mãe ao responder os sinais do embrião ou quando se tem um ambiente uterino inadequado (SARTORI & DODE, 2008).

São vários os estudos que comparam a taxa de prenhez com o estágio de desenvolvimento de embriões bovinos, sendo analisado diversos fatores que possam desencadear os resultados. O principal fator apontado foi o estágio de desenvolvimento embrionário, sendo que embriões que estão em estágios de desenvolvimento mais avançados resultam em maior taxa de gestação, tanto em vacas de leite quanto de corte (FERRAZ et al., 2016; VELOSO NETO et al., 2014; SCANAVEZ et al., 2013).

Objetiva-se com o presente estudo comparar as taxas de prenhez das receptoras de diferentes raças bovinas leiteiras e de corte, conforme o estágio de desenvolvimento do embrião produzido *in vitro* e transferido, discutindo possíveis causas para tais resultados.

Materiais e Métodos

Foram transferidos, durante o período de um ano – julho/2016 a julho/2017 – 475 embriões bovinos a fresco sendo divididos em 4 propriedades de criação de bovinos tanto com finalidade de produção de leite, quanto de corte, situadas em diferentes regiões do estado de Santa Catarina. Na propriedade 1 (P1) foram transferidos 99 embriões, sendo eles das raças Devon e Hereford. Na propriedade 2 (P2) foram transferidos 151 embriões das raças Charolês e Limousin. As propriedades 3 e 4 (P3 e P4) contam com as raças Holandês e Jersey, sendo transferidos, respectivamente, 72 e 153 embriões.

Produção dos embriões:

Os oócitos das doadoras foram coletados através da técnica de aspiração intravaginal folicular guiada pelo ultrassom, com intervalo médio de 20 dias. O aspirado era conforme a disponibilidade presente em ambos os ovários, contendo ou não a presença do corpo lúteo, não sendo realizado protocolo de superovulação nas doadoras.

Os oócitos coletados foram classificados quanto a qualidade em graus 1, 2 e 3 (LEIBFRIED & FIRST, 1979), e armazenados em uma incubadora convencional para serem levados ao laboratório e realizada a maturação *in vitro* (MIV) a 38,5°C em atmosfera umidificada de 5% de CO₂ em ar, durante 24h (22-26h).

Após era feita a fertilização *in vitro* (FIV) com meios fornecidos e procedimentos orientados pela Cenatte® e utilizados sêmens tanto convencionais quanto sexados, descongelados em temperatura de 37°C e 39°C, respectivamente.

O cultivo (CIV) dos embriões era feito 18 – 24h após a FIV. No 4 dia da produção *in vitro* era realizada a clivagem. No dia 7 era realizada o envase dos embriões viáveis para posteriormente serem transferidos.

O envase era feito em média 5 horas antes de ocorrer a transferência dos embriões em palhetas esterilizadas de 0,25ml e após, armazenadas em estufa a 38,5°C para o transporte. Os embriões envasados eram classificados conforme a qualidade em graus 1, 2 e 3, podendo estar em diferentes fases de maturação, sendo elas: mórula (Mo), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx).

Preparação das receptoras:

As receptoras eram sincronizadas com protocolos de transferência de embriões em tempo fixo (TETF). O protocolo nas vacas de leite era realizado através da implantação, no dia 0, de um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®), associado a aplicação de 2mg de benzoato de estradiol (Fertilcare®) por via intramuscular (IM). No dia 5 do protocolo realizava-se a aplicação, por via IM, de 0,00053mg de cloprostenol sódico (Ciosin®). Ao 8º dia se realizava a retirada do dispositivo intravaginal junto com a administração IM de Ciosin® associada a 400 UI de hormônio goadotrófico sérico equino (Folligon®). No dia 9 era realizado 1 mg de Fertilcare® e, por fim, ao 17º dia realizava-se a transferência dos embriões. Nas vacas de corte, é descartado a administração de Ciosin® no 5º dia a fim de evitar o estresse exacerbado dos animais (Figura 1).

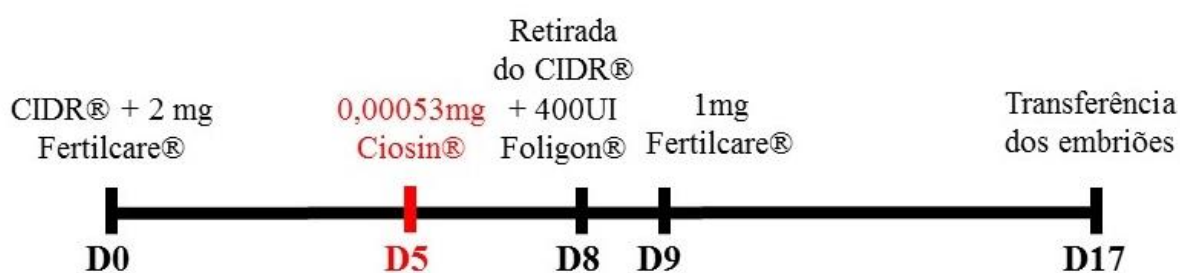


Figura 1 - Protocolo de sincronização de vacas de leite e corte para transferência de embriões. Em destaque, no D5, o procedimento é realizado apenas em vacas de leite.

Antes de ser transferidos os embriões, eram avaliadas individualmente cada receptora para observar se havia ou não a presença de corpo lúteo (CL), bem como o grau de qualidade e em qual ovário se localizava. Assim, receptoras que não apresentavam CL ou que apresentavam, mas de baixa qualidade, eram descartadas para a transferência.

Primeiramente, realizava-se anestesia epidural entre a vértebra sacral e a primeira vértebra caudal com 5mL (4mL em novilhas e Jersey) de cloridrato de lidocaína 2g + epinefrina 0,002g (Anestésico L Pearson®). Após, era feita a lavagem da região anal e vulvar da receptora com água e álcool-iodado e secado com papel-toalha. Com a mão intrarectal como guia, era inserido o inovulador contendo a palheta por via vaginal, depositando o embrião na ponta do corno ipsilateral em que se apresentava o CL, avaliando o grau de inovulação em 1, quando a transferência ocorreu de forma correta e sem dificuldades e grau 2, quando obteve dificuldade na transferência e a ponta do inovulador apresentava indícios de sangue.

A avaliação da prenhez era feita 21 dias após a transferências dos embriões nas receptoras e se fossem confirmadas como prenhes, a sexagem do feto era feita com 60 dias de gestação.

Resultados e Discussão

Dos 475 embriões transferidos, 251 foram nas raças de corte e 224 nas raças de leite, resultando em taxas de prenhez de 41,4% e 34,4%, respectivamente. Sendo que foi observada maior taxa de prenhez para os embriões Bx transferidos do que para os outros estágios de desenvolvimento, tanto no gado de corte, como no de leite (tabelas 01 e 02).

TABELA 01 – Número de transferências e taxa de prenhez aos 60 dias de embriões produzidos *in vitro* e transferidos no D7 em bovinos das raças de corte Charoles, Devon, Limousin e Hereford, referente as propriedades P1 e P2.

Estágio de maturação dos embriões	Número de transferências	Taxa de Prenhez (%)
Mo	44	34
Bi	86	39,5
Bl	76	42
Bx	45	51
Total	251	41,4

TABELA 02 – Número de transferências e taxa de prenhez aos 60 dias de embriões produzidos *in vitro* e transferidos no D7 em bovinos das raças de leite Holandês e Jersey, referente as propriedades P3 e P4.

Estágio de maturação dos embriões	Número de transferências	Taxa de Prenhez (%)
Mo	43	27
Bi	51	23,5
Bl	88	40
Bx	42	43
Total	224	34,4

A taxa de prenhez total obtida nos dois levantamentos (41,4% nas raças de corte e 34,4% nas raças de leite) está dentro da média geral, onde os valores variam de 30 a 55% para ambas as raças (SARTORI & DODE, 2008).

Conforme pode ser observado tanto na TE em gado de leite, como de corte, os embriões que demonstraram a maior taxa de prenhez foram os Bx, quando comparado com os demais estágios de desenvolvimento. Nas raças de corte, dos 45 embriões transferidos em estágio Bx, foi diagnosticado 51% de prenhez, o que foi superior ao encontrado nas raças de leite, onde de 42 embriões transferidos obteve-se uma taxa de prenhez de 43%, tendo uma diferença de 8%.

A relação entre a maior taxa de prenhez e o estágio avançado dos embriões também foi relatada por diversos estudos, como Lacerda et al. (2016) e Silva (2010), onde a taxa de prenhez aos 60 dias dos embriões transferidos em estágios de Bx foram de 40,2% e 44%, respectivamente. Em embriões no estágio Bl, nos mesmos estudos, a taxa de gestação se mostrou inferior ao Bx, sendo, respectivamente, 29,32% e 32,7%.

Ainda, no estudo realizado por Veloso Neto et al. (2014), quando analisaram a taxa de prenhez dos embriões em estágios de desenvolvimento (Bl e Bx) observaram um resultado de 57,14%, sendo superior ao encontrado nos estágios iniciais (Mo e Bi), com apenas 25% de prenhez.

O estágio avançado dos embriões que são produzidos *in vitro* é indicativo de qualidade (FARIN et al., 2004). Como no presente estudo todos os embriões são transferidos com 7 dias de desenvolvimento, os embriões que apresentam estágios mais avançados (Bl e Bx) demonstram uma melhor taxa de prenhez devido a sua maior atividade em relação aos outros, apresentando qualidade superior e, explicando uma possível causa de os resultados serem maiores.

Entretanto, conforme Jainudeen et al. (2004), quando os embriões se apresentam em estágio de desenvolvimento muito precoces ou muito avançados, como no caso das Mo e dos blastocistos eclodidos (Be), as taxas de prenhez são afetadas negativamente. Isso se confirma no estudo realizado por Scanavez et al. (2013), onde a taxa de prenhez de embriões Be foi de 47,1%, enquanto que dos Bx foi de 59,3%, sugerindo que as melhores fases de transferência em relação a taxa de prenhez são os embriões Bl e Bx. Essa afirmativa se confirma nesse estudo, onde as melhores taxas de prenhez em ambas as raças foram provenientes de embriões nos estágios de Bl e Bx.

O estágio de Mo foi o que apresentou menor taxa de prenhez das raças de corte, com 34% casos confirmados. Já nas raças de leite a menor taxa foi verificada em embriões de estágio Bi, tendo 23,5%. A diferença entre embriões Mo e Bi no gado de corte foi de 5,5% (tabela 01) e no de leite foi de 3,5% (tabela 02), não tendo uma grande diferença e indicando que os estágios de Mo e Bi são os que apresentam taxa de prenhez inferior aos demais.

Os baixos índices de gestação nos embriões em estágio de Mo e Bi também foram citados por Looney et al. (2006), onde afirma que além de embriões precoces, a qualidade dos embriões também influencia nas taxas de prenhes, sendo que, quanto maior a qualidade, maior os resultados esperados.

Embriões que são produzidos *in vitro* apresentam algumas modificações que afetam na sua qualidade e chance de sobrevivência, ocasionando baixas taxas de gestações. Conforme Farin et al. (2004), ocorre a presença maior de quantidade de lipídeos intracelulares, massa celular interna compactada de forma incompleta e alterações na densidade mitocondrial. Como os embriões em estágio de Mo e Bi estão em desenvolvimento atrasado, quando comparado com os demais aos 7 dias, pressupõe-se que a qualidade dos mesmos também sofre influência negativa, tendo maiores dificuldades em sobreviver e sinalizar a gestação para a receptora bovina.

Em estudo realizado por Hasler (1998), quando comparou a idade dos embriões, o estágio de desenvolvimento e a taxa de gestação, obteve como resultado de que embriões grau I, de dias 7, 8 e 9 de cultivo, resultaram em uma taxa de prenhez de, respectivamente, 56%, 48% e 41%. Ainda, em relação ao estágio de desenvolvimento, notou-se que embriões B1 e Bx apresentaram maior taxa de prenhez no D7 (56% e 63%, respectivamente), enquanto que no D8 (49% e 47%, respectivamente).

Assim como observado em outros estudos (JAINUDEEN et al., 2004; SCANAVEZ et al., 2013), embriões que se desenvolvem mais rápido, ou seja, atingem o estágio de Bx aos 7 dias, demonstram maior viabilidade na transferência, podendo ser um indicativo de qualidade. Podendo ser visto no estudo realizado por Scanavez et al. (2013), onde os embriões de dia 7 apresentaram taxa de 59,2%, enquanto que os de dia 8 apresentaram de 45,6% aos 28 dias de gestação. Em relação a taxa de perda de gestação aos 55 dias, os embriões com 7 dias obtiveram 8,6% de perda, enquanto que os de 8 dias tiveram 21% de perda.

Considerações Finais

Por tanto, os estágios de desenvolvimentos dos embriões bovinos, tanto leiteiros, como de corte, interferem nos resultados das taxas de prenhez. Sendo que, os embriões que chegam ao estágio de Bx aos 7 dias de cultivo apresentam melhores taxas de prenhez, o que está relacionado com um melhor desenvolvimento *in vitro* e posterior a transferência nas receptoras. Ainda, os embriões em estágios recentes (Mo e Bi) proporcionam uma taxa de prenhez inferior à média geral citada em outros estudos.

Referências Bibliográficas

FARIN, C. E.; FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A. Development of fetuses from in vitro – produced and cloned bovine embryos. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 53-62, 2004.

FARIN, P. W.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, n. 55, p. 151-170, 2001.

FERRAZ, P. A. et al. Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. **Theriogenology**, v. 86, ed. 7, p. 1834-1841, 2016.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.33, n.2, p.82-94, abr./jun. 2009.

HASLER, J. F. The current status of oocyte recovery, in vitro embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with na emphasis on the bovine. **J. Anim. Sci.**, 76 (Suppl. 3): 52-74, 1998.

HONORATO, M. T., et al. Importância da escolha de receptoras em um programa de transferência de embriões em bovinos. **PUBVET**, Londrina, v.7, n.19, ed. 242, art. 1601, 2013.

JAINUDEEN M.R. et al. Indução da ovulação, produção e transferência de embriões In: HAFEZ, E.S.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. São Paulo. Ed Manole, 2004.

LACERDA, I. P. et al.; Efeito da raça da doadora sobre a eficiência da produção *in vitro* de embriões bovinos. In: **Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, Foz do Iguaçu – PR, 2016.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **J. Anim. Sci.**, v.48, p.76-86, 1979. Disponível em: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/48/1/JAN0480010076?access=0&view=pdf>. Acesso em: 30/09/2017.

LOONEY, C. R.; et al. Improving fertility in beef cow recipients. **Theriogenology**, v. 65, p. 201-209, 2006.

MELLOa, R. R. C. et al. Taxa de prenhez em receptoras bovinas com diferentes graus de assincronia embrião-útero. **B. Industr. Anim.**, Nova Odessa, v.73, n.1, p.88-93, 2016.

MELLOb, R. R. C. et al. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.40, n.2, p. 58-64, abr./jun. 2016.

PEREIRA, M. M., et al. Quantificação de transcritos maternos em oócitos bovinos submetidos a diferentes condições de maturação. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v.62, n.6, p.1394-1400, 2010.

SARTORI, R.; DODE, M. A. N. Mortalidade embrionária na IA, TE, FIV e clonagem. In: **Biotecnologia da Reprodução em bovinos**. 3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina – PR, 2008.

SCANAVEZ, A. L.; CAMPOS, C. C.; SANTOS, R. M. Taxa de prenhez e perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.3, p.722-728, 2013.

SILVA, J. S. da.; et al. Aspectos comerciais da transferência de embriões e fertilização *in vitro* em bovinos – revisão. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.12, nº5, p. 4316-4319, 2015.

SILVA, L. de A. **Taxa de gestação e mortalidade embrionária em receptoras de embriões produzidos *in vitro*, após sincronização do estro com diferentes protocolos hormonais**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal. Belo Horizonte, MG, 2010.

VELOSO NETO, H. F. et al. Parâmetros que afetam a taxa de prenhez de receptoras bovinas de embriões produzidos *in vitro*. **Medicina Veterinária**, v. 8, n.3, p. 31-35. Recife, PE, 2014.