



Parâmetros que afetam a taxa de prenhez de receptoras bovinas de embriões produzidos *in vitro*

[Parameters affecting the pregnancy rate in recipients females of bovine embryos produced *in vitro*]

"Artigo Científico/Scientific Article"

HF Veloso Neto¹, JCF Silva¹, LC Pereira¹, JCO Andrade², MT Moura¹,
CC Bartolomeu¹, PF Lima¹, MAL Oliveira^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia aplicada à Reprodução Animal, DMV, UFRPE, Recife, PE, Brasil.

²Médico Veterinário Autônomo.

Resumo

Objetivou-se avaliar taxas de prenhez de embriões produzidos *in vitro*, considerando o grau de desenvolvimento do embrião, sincronia entre receptora e embrião, bem como de acordo com a classificação do corpo lúteo. Foram utilizadas 134 novilhas como receptoras selecionadas de acordo com a conformação pélvica, escore de condição corporal e estado sanitário. Os ovócitos das doadoras Nelore foram coletados por aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom e a produção dos embriões foi realizada pela empresa InVitro[®]. A taxa de prenhez dos embriões classificados como desenvolvidos (57,14%) apresentou melhores índices ($P < 0,05$) do que os classificados como jovens (25,00%). As taxas de prenhez resultantes da sincronia embrião/receptora foram de 68,42% (-1), de 88,88% (0) e de 41,50% (+1), verificando-se que a taxa da sincronia +1 foi menor ($P < 0,01$) do que as demais. Com relação à prenhez segundo o tamanho do corpo lúteo foram registrados valores de 46,83% (CL1), 55,88% (CL2) e de 42,85% (CL3), não sendo observada diferença ($P > 0,05$). Conclui-se que para um programa de transferência de embriões oriundos de FIV é necessário considerar a sincronia do embrião com a receptora, bem como o grau de desenvolvimento do embrião, todavia, o tamanho do corpo lúteo não é relevante.

Palavras-chave: sincronia, corpo lúteo, FIV.

Abstract

The work was aimed to evaluate the pregnancy rate of *in vitro* produced embryos considering embryonic stage of development, synchrony between recipient cow and embryo, as well as *corpus luteum* classification. A total of 134 heifers were selected as recipients based upon pelvic conformation, body condition score and sanitary condition. The oocytes were collected from Nelore donor cows by ultrasound guided transvaginal follicular aspiration and *in vitro* embryo production was performed by InVitro[®] company. The pregnancy rate from embryos classified as developed (57.14%) showed better rates ($P < 0.05$) than those classified as young (25.00%). The pregnancies resulting from embryo/recipient synchrony were 68.42% (-1), 88.88% (0) and 41.50% (+1), where the pregnancy rate of +1 synchrony was lower ($P < 0.01$) than the remaining groups. In regards to pregnancy rate based upon *corpus luteum*, the resulting rates were 46.83% (CL1), 55.88% (CL2) and 42.85% (CL3), with no difference between groups ($P > 0.05$). In conclusion, in an embryo transfer program it is necessary to consider the synchrony between embryo and the recipient cow, as well as embryo stage of development, however, the size of the *corpus luteum* is not relevant.

Key words: synchrony, *corpus luteum*, IVF.

Introdução

A bovinocultura é uma das atividades da agropecuária mais difundida em todos os

continentes, tendo como alicerce à nutrição, a sanidade, a melhoria genética e a reprodução, utilizando-se a inseminação artificial e a

*Autor para correspondência/Corresponding author: DMV/ Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manuel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, CEP 52171-900. E-mail: maloufrpe@uol.com.br

Recebido em: 1 de agosto de 2014.

Aceito em: 15 de agosto de 2014.

transferência de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* como principais biotécnicas (VIEIRA, 2012).

A fecundação *in vitro* (FIV) tornou-se uma alternativa viável para a produção de embriões na espécie bovina, especialmente nas raças zebuínas (VIANA et al., 2012). A expansão da produção *in vitro* no Brasil tem sido utilizada não somente na pesquisa científica, sobretudo no âmbito comercial através da aspiração folicular ovariana guiada por ultrassom (RUBIN et al., 2009).

Com o advento de novas técnicas de reprodução assistida, os problemas de mortalidade embrionária precoce tornaram-se mais evidentes, principalmente aqueles relacionados aos defeitos intrínsecos do embrião que tem aumentado proporcionalmente a sofisticação da técnica (SARTORI e DODE, 2008).

O estágio de desenvolvimento embrionário, a sincronia entre embriões/doadoras/ receptoras, bem como a qualidade do embrião e do corpo lúteo são aspectos importantes a serem considerados num programa de transferência de embrião, tanto produzidos *in vivo* quanto *in vitro*, por influenciarem diretamente sobre a prenhez (PEIXOTO et al., 2007; ANDRADE et al., 2012; HASLER et al., 1987, DIAS et al., 2006, LEAL et al., 2009, SPELL et al., 2001).

Com esse trabalho objetivou-se avaliar a prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro* através da determinação da influência do grau de desenvolvimento embrionário, da sincronia entre receptora e embrião e do tamanho do corpo lúteo sobre a taxa de prenhez.

Material e Métodos

O trabalho foi submetido e aprovado pela CEUA-UFRPE sob licença nº 009/2012, obedecendo às normas do comitê de ética e experimentação animal.

Utilizou-se, como receptoras, 134 novilhas mestiças (Red Angus x Zebu) que apresentavam ciclo estral regular, peso médio de 350 kg e estado de condição corporal equivalente a 3, numa escala de 1 a 5, conforme classificação de Lowman et al. (1976). As fêmeas eram criadas em piquetes formados por pastagens de *Brachiaria*

decumbens e *Brachiaria brizantha* CV. GM5, além da oferta de sal mineral proteinado e água *ad libitum*.

A aspiração folicular foi realizada por via transvaginal guiada por ultrassom. Os ovócitos aspirados foram classificados, segundo Palma (2001), em escala variando de 1 a 4, colocados em meio de cultivo e transportados ao laboratório em incubadoras portáteis a 38,5 °C contendo 5% CO₂. No laboratório foram transferidos para estufa de cultivo visando completar a maturação durante 24 horas. Posteriormente, foram expostos aos espermatozoides e após a fecundação foram cultivados durante sete dias conforme recomendação da empresa InVitro®. Finalizado o cultivo, os embriões selecionados foram aqueles classificados como grau 1, segundo Wright (1998).

As receptoras foram submetidas ao protocolo de transferência de embrião em tempo fixo. Receberam, no dia zero (D0), o dispositivo intravaginal de progestágeno, juntamente com a administração intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol. No sétimo dia (D7) foi administrado 200 UI de eCG e 0,150 mg de D-cloprostenol e no oitavo (D8) procedeu-se a retirada do dispositivo e foi aplicado 0,5 mg de benzoato de estradiol intramuscularmente. No décimo sétimo dia (D17) foi realizada a transferência em tempo fixo pelo método não cirúrgico por técnico habilitado.

Imediatamente antes da transferência, as receptoras foram avaliadas, por palpação retal, quanto à presença de corpo lúteo (CL) e em seguida distribuídas nos três grupos experimentais. Antes da transferência, o CL foi palpado e avaliado conforme seu tamanho para classificá-lo em grande (CL1), médio (CL2) e pequeno (CL3), segundo Leal et al. (2009). Os embriões produzidos *in vitro* foram depositados no terço final do corno uterino ipsilateral ao ovário com corpo lúteo presente.

A sincronia (S) entre embrião e receptora foi definida de acordo com o dia de exteriorização do estro, sendo um dia após a FIV (S/-1), no dia da FIV (S/0) e um dia antes da FIV (S/+1).

O estágio de desenvolvimento embrionário foi classificado de acordo com Fonseca et al. (2001), em estágio inicial (mórula: Mo; blastocisto inicial: Bli) e estágio

desenvolvido (blastocisto: Bl; blastocisto expandido: Blx).O diagnóstico de prenhez foi realizado entre o 30^o e o 35^o dia após a transferência por ultrassonografia com aparelho Mindray® DP2200Vet.

As taxas de prenhez foram avaliadas por teste χ^2 utilizando o programa StatPlus® 2009, considerando $P < 0,05$ como significativo.

Resultados

Dos 134 embriões transferidos, obteve-se uma taxa de 48, 50% de prenhez. As Tabelas 1, 2 e 3 contêm os dados relativos ao desenvolvimento embrionário, à sincronia entre receptora e embrião e ao tamanho do corpo lúteo.

Tabela 1. Taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos PIV, de acordo com o estágio de desenvolvimento do embrião

Desenvolvimento Embrião	Prenhez		Valor de P
	n/n	%	
Estádio Inicial (Mo, Bli)	9/36	25%	0,019
Estádio Desenvolvido (Bl, Blx)	56/98	57,14%	

Resultado significativo para $P < 0,05$.

Tabela 2. Taxas de prenhez de receptoras de embriões bovinos PIV, de acordo com a sincronia entre estro e FIV

Sincronia	Prenhez		Valor de P
	n/n	%	
S/-1	13/19	68,42%	0,004
S/0	8/9	88,88%	
S/+1	44/106	41,85%	

Resultado significativo para $P < 0,05$.

Tabela 3. Taxa de prenhez de receptora de embriões PIV, de acordo com o tamanho do corpo lúteo

Tamanho do Corpo Lúteo	Prenhez		Valor de P
	n/n	%	
Grande (CL1)	37/79	46,83	0,577
Médio (CL2)	19/34	55,88	
Pequeno (CL3)	9/21	42,85	

Resultado significativo para $P < 0,05$.

Discussão

Existem vários relatos sobre taxas de prenhez de receptoras bovinas com embriões produzidos *in vitro* variando de 30 a 51% (HASLER, 2000; FARIN et al., 2001; LANE et al., 2003; DIAS et al., 2006; SCHMIDT, 2007; ANDRADE et al., 2012), as quais são inferiores aquelas obtidas com os produzidos *in vivo* (HASLER et al., 2003). Segundo Farin

et al. (2001), o mecanismo de reconhecimento materno da gestação de parte desses embriões é mais tardio, conseqüentemente, infere menores taxas de prenhez do que os produzidos *in vivo*.

Alguns relatos mostram que a taxa de prenhez resultante da transferência de embriões produzidos *in vivo* é maior quando

são utilizados aqueles nos estádios de desenvolvimento inicial (HANEKAMP, 1999; PEIXOTO et al., 2007; BÓ et al., 2012), apesar de Jainudeen et al. (2004) citarem que estádios de desenvolvimento muito precoces ou muito tardios contribuem para baixas taxas de prenhez. Embriões de ruminantes têm desenvolvimento semelhante até o estágio de oito células, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, todavia, a partir deste momento, o desenvolvimento *in vitro* é mais lento (THOMPSON, 2000; FONTANIER-RAZZAQ et al., 2001), além do cultivo poder exercer efeito significativo sobre o metabolismo embrionário que altera sua qualidade (RIZOS et al., 2002).

Segundo Hasler et al. (2003), as diferenças bioquímicas e metabólicas podem afetar os resultados das taxas de prenhez após a transferência, afirmação corroborada nesse trabalho, ao ter sido observado que a prenhez foi superior com os embriões transferidos em estádios mais avançados de desenvolvimento. Esse fato evidencia que aqueles transferidos em estádios iniciais deviam apresentar alteração bioquímica ou metabólica que retardou o desenvolvimento e comprometeu o resultado de prenhez.

A sincronia do embrião com a receptora foi outro parâmetro que influenciou a taxa de prenhez, corroborando os dados de Andrade et al. (2012). Possivelmente, tal comportamento seja devido o embrião transferido na sincronia S/0 e S/-1 ter tido maior tempo de desenvolvimento no ambiente uterino e desse modo ter inibido a luteólise de forma adequada. Segundo Binelli et al. (2001), a luteólise inicia entre o 15^o e o 17^o dia do ciclo estral e, se nesse período, o embrião não tiver produzido concentração adequada de interferon- τ , não ocorrerá o reconhecimento materno da gestação.

O fato do tamanho do CL não ter exercido influência sobre as taxas de prenhez evidencia que seu tamanho não pode ser responsabilizado de forma isolada pela perda embrionária. Resultado similar foi verificado por Vieira et al. (2002) e Leal et al. (2009), os quais ainda afirmaram que o CL de maior tamanho produz maior concentração de progesterona do que aqueles classificados como de tamanho médio e pequeno, entretanto, sem interferir na taxa de gestação.

Comentaram adicionalmente que um CL diagnosticado como pequeno, por palpação retal, não significa que seu tamanho no estroma ovariano seja também pequeno e que um CL com projeção maior pode conter pouca massa lútea. Assim, é possível sugerir que sua presença é mais importante do que sua classificação quanto ao tamanho.

Os resultados permitem concluir que a qualidade do desenvolvimento do embrião transferido, bem como que a sincronia da FIV com o estro da receptora são aspectos determinantes que devem ser considerados num programa de transferência de embriões produzidos *in vitro* por interferirem diretamente nos resultados de prenhez.

Referências

- ANDRADE, G.A. et al. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.36, n.1, p.66-69, 2012.
- BINELLI, M. et al. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.56, p.1451-1463, 2001.
- BÓ, G.A. et al. Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 24, p. 272-277, 2012.
- DIAS C.C. et al. Fatores relacionados ao embrião e à receptora que influenciam o sucesso das transferências de embriões de coleta convencional ou de fertilização *in vitro*. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.34, p.412, 2006.
- FARIN P.W. et al. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, p.151-170, 2001.
- FONSECA, J.F. et al. Estádios de desenvolvimento embrionário de vacas zebuínas superovuladas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.53, n.6, p.671-676, 2001.
- FONTANIER-RAZZAQ, N. et al. DNA damaging agents increase gadd153 (CHOP-10) messenger RNA levels in bovine preimplantation embryos cultured *in vitro*. **Biology of Reproduction**, Madison, v.64, n.5, p.1386-1391, 2001.
- HANEKAMP, W.J.A. Transfer of beef embryos in dairy cows: influence of recipient and embryo quality on pregnancy rate and calving performance. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.39, p.459-463, 1999.
- HASLER, J.F. *In vitro* culture of bovine embryos in Ménézo's B2 medium with or without coculture and

- serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60, p.81-91, 2000.
- HASLER, J.F. et al. Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. **Theriogenology**, Los Altos, v.59, p.1919-1928, 2003.
- HASLER, J.F. et al. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in large-scale bovine embryo transfer program, **Theriogenology**, Los Altos, v.27, n.1, p.139-168, 1987.
- 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.
- LANE, M. et al. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. **Theriogenology**, Los Altos, v.60, p.407-419, 2003.
- LEAL, L.S. et al. Avaliação do corpo lúteo, contratilidade uterina e concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol em receptoras de embriões bovinos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.10, p.174-183, 2009.
- PALMA G.A. **Biotecnología de la reproducción**. Balcarce: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária, 2001, 701p.
- PEIXOTO, M.G.C.D. et al. Logistic regression analysis of pregnancy rate following transfer of *Bos indicus* embryos into *Bos indicus* and *Bos taurus* heifers **Theriogenology**, Los Altos, v. 67, p.287-292, 2007.
- RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction Development**, New York, v.61, n.2, p.234-248, 2002.
- RUBIN, M.I.B. et al. Produção *in vitro* de embriões e Clonagem: um caminho conhecido? **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n.6, p.77-85, 2009.
- SARTORI, R.; DODE, M.A.N. Mortalidade embrionária na IA, TE, FIV e clonagem In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3., 2008, Londrina. **Anais...** Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2008. p.175-194.
- SCHMIDT M. Perinatal death associated with ET, IVP and cloning in cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Upsala, v.49, p.13, 2007.
- SPELL, A.R. et al. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.56, p.287-97, 2001.
- THOMPSON, J. G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos -- a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.60-61, p.263-275, 2000.
- VIANA, J.H.M. et al. Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry **Animal Reproduction**, Edinburgh, v.9, n.1, p.12-18, 2012.
- VIEIRA, R.C. et al. Relação entre a morfologia do corpo lúteo e índices de prenhez em receptoras de embriões bovinos. **Bioscience Journal**, v.18, n.2, p.99-102, 2002.
- VIEIRA, R. J. Biotécnicas aplicadas à reprodução bovina: generalidades. **Ciência Animal**, Fortaleza, v.22, n.1 p.55-65, 2012.
- WRIGHT J.M. Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality scores. In: Stringfellow, D.A. **Manual of the International Embryo Transfer Society**. Savoy: Seidel SM (Ed.), 1998. 3.ed., p.167-170.