



Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Factors affecting pregnancy rate of recipients of bovine embryos produced in vitro

G.A. Andrade^{1,2}, M.A. Fernandes², R.M. Knychala², M.V. Pereira Junior¹, A.J. Oliveira¹, D.P. Nunes¹, G.L. Bonato¹, R.M. Santos¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

²Médico Veterinário, Vale do Embrião, Uberlândia, MG, Brasil.

³Correspondência: gabi_bonato@hotmail.com

Resumo

A variabilidade do sucesso das transferências de embriões produzidos *in vitro* ainda é um dos entraves para sua expansão, e a maioria dos problemas são relacionados com as receptoras. Objetivou-se avaliar, em 1506 transferências de embriões das raças Nelore e Senepol produzidos *in vitro*, quais os fatores que poderiam influenciar na taxa de prenhez das receptoras. Não foi detectado efeito de raça na porcentagem de prenhez, sendo de 39,1% (n = 801) para os embriões da raça Nelore e de 37,6% (n = 705) para os da raça Senepol. A qualidade do embrião e o lado do corpo lúteo (CL) não tiveram efeito na taxa de prenhez. Foi detectado efeito (P < 0,05) da qualidade do CL (CL1 = 41,4% vs. CL2 = 33,6% vs. CL3 = 21,9%) e da sincronia embrião/receptora (-1 = 44,4% vs. 0 = 58,0% vs. 37,3%) na taxa de prenhez. Pode-se concluir que devem ser utilizadas receptoras com CL de boa qualidade e de preferência com sincronia zero em relação ao embrião.

Palavras-chave: corpo lúteo, produção *in vitro*, sincronia.

Abstract

The success variability of embryo produced in vitro transfers still been an impediment for the expansion of this technique, in the majority the problems are related with the recipient cow. The objective was to evaluate, in 1506 embryo transfers Nelore and Senepol produced in vitro, what factors may influence the pregnancy rate of recipients. There was no detectable effect of race in pregnancy rate, with 39.1% (n = 801) for embryos Nelore and 37.6% (n = 705) for the race Senepol. The quality of the embryo and the side of the SC had no effect on pregnancy rate. Effect was detected (P < 0.05) the quality of CL (CL1 = 41.4% vs. CL2 = 33.6% vs. CL3 = 21.9%) and embryo synchrony/receiver (-1 = 44, vs. 4%. 0 = 58.0% vs. 37.3%) in the pregnancy rate. It can be concluded that recipients must be used with CL of good quality and preferably zero synchrony of the embryo.

Keywords: corpus luteum, in vitro production, sync.

Introdução

Embora a transferência de embriões seja uma técnica amplamente empregada em todo o mundo, com mais de 500 mil embriões transferidos por ano, a variabilidade da resposta ao tratamento superovulatório ainda é uma importante limitação desta técnica (Bó et al., 2002). Com a produção *in vitro* (PIV) de embriões, é possível produzir embriões na espécie bovina sem levar em consideração o estágio do ciclo estral das doadoras, podendo-se repetir o procedimento sem interferir negativamente no número de oócitos recuperados (Varago et al., 2008).

Bueno e Beltran (2008) ressaltam que um dos objetivos da PIV comercial é a obtenção de embriões viáveis de fêmeas que não estão mais aptas a produzirem descendentes pelas técnicas convencionais, como doadoras que apresentam infertilidade ou distúrbios patológicos do aparelho reprodutor feminino. Além disso, a PIV, associada à coleta de oócitos a partir da punção folicular guiada por ultrassom (*ovum pick up* - OPU), tem sido utilizada, de forma geral, como instrumento importante para maximização do potencial reprodutivo dos rebanhos, aumentando o número de descendentes, diminuindo o intervalo entre gerações e acelerando o melhoramento genético animal (Varago et al., 2008).

Nos últimos 10 anos, contudo, ocorreu uma grande expansão destas tecnologias, impulsionadas pelo mercado de raças de corte zebuínas, particularmente a Nelore (que chegou a representar mais de 80% do total de embriões transferidos; Viana, 2008). A raça Senepol também vem se destacando dentro dos programas de PIV, pois, apesar de ser uma raça composta, ela reúne as características de precocidade e qualidade de carne do *Bos Taurus* com a rusticidade do *Bos Indicus*. Outro fator determinante para a viabilização da PIV no Brasil é a extensão do rebanho zebu, a qual proporciona uma escala maior de doadoras e receptoras, além do fato de que as médias de oócitos aspirados de vacas zebuínas são muito superiores às observadas em raças taurinas (Seneda et al., 2005).



Assim sendo, vários são os fatores responsáveis pelos resultados obtidos num programa de PIV. A concentração de progesterona reflete o crescimento, a manutenção e a regressão luteal (Spano e Silva, 1992). Desse fato decorre a necessidade de se avaliar tamanho e qualidade do corpo lúteo, pois ele é responsável pela produção de progesterona, que vai controlar o ambiente uterino, essencial ao desenvolvimento embrionário e à manutenção da prenhez (Thatcher et al., 2001).

O método mais usual e prático para a escolha de receptoras ainda é a projeção do corpo lúteo (CL) por palpação retal. Viana (1996) abordou que esta metodologia não é a mais adequada, pois um CL com pequena projeção pode apresentar uma grande porção inclusa no estroma ovariano e vice-versa. Diante disso, a avaliação ultrassonográfica é muito importante, pois permite avaliar a completa visualização do CL.

Em suma, objetivou-se com este trabalho avaliar os fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras mestiças de embriões das raças Nelore e Senepol produzidos *in vitro* na região do Triângulo Mineiro.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na central Vale do Embrião, situada no município de Uberlândia, MG, no período de janeiro a dezembro de 2009. Foram utilizadas como receptoras de embriões 1506 novilhas mestiças. Estes animais foram mantidos a pasto e com sal mineral à vontade. As doadoras de ovócitos eram fêmeas das raças Nelore e Senepol oriundas de clientes da central. As doadoras e receptoras ficaram alojadas na central ou em fazendas de clientes.

A aspiração folicular foi realizada com a técnica de aspiração transvaginal guiada por ultrassom, também conhecida como OPU (*Ovum Pick-Up*). Os ovócitos aspirados eram classificados quanto à qualidade em graus de 1 a 4 (Palma, 2001) e transportados ao laboratório, onde foram maturados, fertilizados e cultivados sob ambiente controlado. Após a produção, os embriões foram classificados, sendo utilizados apenas os de grau 1 – excelente, ou grau 2 – bom (Wright, 1998).

Foram selecionadas como receptoras novilhas mestiças provenientes da própria central ou dos proprietários clientes da central, na região do Triângulo Mineiro e no sul de Goiás. As receptoras passaram por uma avaliação visual de seu estado geral (escore de condição corporal, presença de excesso de ectoparasitas). Aquelas que apresentaram melhores condições físicas foram selecionadas, passaram por exames de avaliação do útero e dos ovários por palpação retal e exame de Brucelose.

As novilhas aprovadas nesses testes foram utilizadas como receptoras de embriões. O passo seguinte foi a sincronização da ovulação, cujo protocolo variou dependendo da origem das receptoras. A sincronia entre embrião/receptora foi definida como: Sincronia -1: a receptora deu cio um dia depois da fertilização *in vitro* (FIV); Sincronia 0: a receptora deu cio no dia da FIV; e Sincronia +1: a receptora deu cio um dia antes da FIV.

Antes da inovulação, as receptoras foram avaliadas por palpação retal para determinação da presença do CL e o lado dele (ovário direito ou esquerdo), bem como para a classificação em 1 - excelente, 2 - bom, 3 - regular. Somente as novilhas que possuíam CL receberam embrião. Após anestesia epidural, os embriões produzidos *in vitro* foram transferidos no terço final do corno uterino ipsilateral ao ovário com CL presente. A transferência dos embriões foi realizada por técnicos especializados, pelo método transcervical (não cirúrgico).

O diagnóstico de prenhez foi realizado entre 30 e 35 dias após a inovulação, por ultrassonografia (Mindray® DP2200Vet), e confirmado 60 dias após a inovulação por palpação retal.

A variável taxa de prenhez foi avaliada por regressão logística no programa MINITAB. Foram incluídos no modelo os efeitos de raça do embrião, da qualidade do embrião, do lado do CL, da qualidade do CL e da sincronia embrião/receptora.

Resultados e Discussão

A raça do embrião não teve efeito ($P = 0,55$) sobre a taxa de prenhez (Tab. 1), pois provavelmente a taxa de gestação não depende da raça do embrião e sim de outros fatores, como a qualidade dele. Seria de se esperar que o genótipo da doadora influenciasse a taxa de prenhez, uma vez que existem diferenças na fisiologia reprodutiva e na capacidade de adaptação ao meio entre os genótipos Nelore e Senepol, porém Rebelo (2008) relatou que a variável genótipo da receptora não influenciou a taxa de prenhez, assim como o genótipo da doadora (Callesen et al., 1995).

A qualidade do embrião não teve influência ($P = 0,11$) na taxa de prenhez (Tab. 1), provavelmente porque foram utilizados apenas embriões de graus 1 e 2. O número de embriões avaliados foi desproporcional: foram avaliados 1423 embriões de grau 1 e 83 de grau 2. Spell et al. (2001) também não detectaram efeito dessa variável. Já Shulman et al. (1993) destacaram a grande importância dessa característica para a obtenção de bons resultados, uma vez que os embriões ótimos e bons resultaram significativamente em melhores índices de prenhez quando comparados aos embriões de pior qualidade. Existe uma relação positiva entre a qualidade morfológica dos embriões e a posterior taxa de prenhez (Alvarez et al., 2008).

O lado do corpo lúteo também não teve efeito ($P = 0,90$) na taxa de prenhez (Tab. 1), pois não importa o lado em que a receptora teve a ovulação, e sim a qualidade do corpo lúteo que a receptora possuía no momento



da involução. Mello (2004) encontrou taxa de prenhez semelhante entre receptoras que apresentavam CL do lado direito ou esquerdo, confirmando os resultados obtidos neste experimento. De fato, Demczuk et al. (1998) relataram haver maior número de ovulações no lado direito (36,0 e 64,0%, respectivamente, para o lado esquerdo e direito), não afetando, porém, a taxa de prenhez.

Tabela 1. Efeito do genótipo, da qualidade do embrião, do lado do corpo lúteo, da qualidade do corpo lúteo e da sincronia embrião/receptora na taxa de prenhez de receptoras mestiças de embriões mantidas na região do Triângulo Mineiro, Uberlândia, MG, 2010.

Variável	Taxa de concepção % (n)	Valor de P
Genótipo do embrião		
Nelore	39,1% (801)	0,55
Senepol	37,6% (705)	
Qualidade do embrião		
Grau 1	38,9% (1423)	0,11
Grau 2	28,9% (83)	
Lado do CL		
Direito	36,8% (931)	0,9
Esquerdo	40,9% (575)	
Qualidade do CL		
1	41,4% (983)	0,001
2	33,6% (482)	
3	21,9% (41)	
Sincronia		
-1	44,4% (36)	0,002
0	58,0% (69)	
+1	37,3% (1401)	

Leal et al. (2009) não encontraram diferenças significativas na taxa de prenhez em relação ao tamanho/diâmetro do CL (pequeno, médio e grande). Os CLs considerados grandes produziram maior quantidade de progesterona em relação aos pequenos e médios, porém isto não afetou as porcentagens de prenhez. A qualidade do CL, entretanto, teve efeito ($P = <0,001$) na taxa de prenhez neste estudo (Tab. 1), sendo que a melhor taxa de prenhez foi para a qualidade 1 do CL (corpo lúteo excelente). Esses resultados estão de acordo com os apresentados por Spell et al. (2001), que classificaram os CLs em excelentes ou bons (diâmetro palpável >10 mm e consistência firme 66%) e ruins (diâmetro palpável <10 mm e textura macia 33%) e demonstraram a significativa influência da qualidade do CL das receptoras sobre a taxa de prenhez. Já Vieira et al. (2002) observaram índices que contrastam com o presente estudo, não encontrando diferença nos índices de prenhez em relação à qualidade do CL.

Também foi detectado efeito ($P = 0,002$) da sincronia entre embrião/receptora na taxa de prenhez (Tab. 1). Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os estudos de Dias et al. (2006), que obtiveram resultados semelhantes e descreveram que a taxa de prenhez foi influenciada pela sincronia embrião-receptora, concluindo que esta variável é um dos parâmetros mais importantes na seleção das receptoras para um programa de PIV de embriões. Em contrapartida, Spell et al. (2001) não encontraram efeito de sincronismo na taxa de prenhez.

Peixoto et al. (2004) citaram melhores taxas de prenhez em receptoras que deram cio um dia antes da aspiração folicular, ou um dia antes do cio da doadora. Segundo Callesen et al. (1996), isto poderia ocorrer devido ao estabelecimento das condições uterinas ideais mais cedo. A sincronia entre o ambiente uterino e o embrião é essencial para maximizar a sobrevivência embrionária, sendo a progesterona importante por controlar mudanças no útero, além de influenciar o crescimento embrionário (Reis et al., 2006).

Não foi detectado efeito da raça do embrião, da qualidade do embrião e do lado do CL na taxa de prenhez em receptoras de embriões de PIV, porém foi detectado efeito da qualidade do corpo lúteo e da sincronia entre embrião/receptora. Pode-se concluir que devem ser utilizadas receptoras que apresentem corpo lúteo de qualidade excelente e com sincronia zero em relação à idade do embrião.

Referências

Alvarez RH, Meneghel M, Martinez AC, Pires, RML, Schammas EA. Transfer of bovine blastocysts derived from short-term *in vitro* culture of low quality morulae produced *in vivo*. *Reprod Domest Anim*, v.43,



p.257-260, 2008.

Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, v.57, p.53-72, 2002.

Bueno AP, Beltran MP. Produção *in vitro* de embriões bovinos. *Rev Cient Eletron Med Vet*, v.6, n.11, 2008. Disponível em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria11/revisao/edic-vi-n11-R183.pdf>.

Callesen H, Liboriussen T, Greve T. Practical aspects of multiple ovulation-embryo transfer in cattle. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.205-214, 1996.

Callesen H, Lovendahl P, Bak A, Greve T. Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. *J Anim Sci*, v.73, p.1539-1543, 1995.

Demczuk E, Kozicki LE, Pontelli ES, Salles JO. Transferência de embrião em vacas da raça Simental na região noroeste do Paraná e sul do Mato Grosso do Sul. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.35, p.174-177, 1998.

Dias CC, Alvim MTT, Saliba WP, Vasconcelos JLM. Fatores relacionados ao embrião e à receptora que influenciam o sucesso das transferências de embriões de coleta convencional ou de fertilização *in vitro*. *Acta Sci. Vet*, v.34, p.412, 2006. Resumo.

Leal LS, Oba E, Fernandes AAC, Sá Filho OG. Avaliação do corpo lúteo, contratilidade uterina e concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol em receptoras de embriões bovinos. *Cienc Anim Bras*, v.10, p.174-183, 2009.

Mello VF. Influência da receptora e do embrião sobre a viabilidade embrionária e sexo determinados através de ultrassonografia. 2004. 105f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2004.

Palma GA. Biotecnología de la reproducción. Balcarce: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária, 2001, 701p.

Peixoto MGCD, Bergmann JAG, Alvim MTT, Penna VM. Fatores que influenciaram a prenhez de embriões zebuínos em receptoras mestiças. In: Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 5, 2004, Pirassununga, SP. Pirassununga, SP: SBMA, 2004. 4p.

Rebelo CSS. Influência do genótipo das doadoras de embriões bovinos (*Bos taurus* ou *Bos indicus*) sobre a taxa de gestação. 2008. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.5/978>.

Reis AR, Metelo P, Santos F, Silva M. Efeito da estrutura ovárica e da idade de bovinos da raça Holstein Friesian na quantidade e qualidade de ovócitos e de embriões produzidos *in vitro*. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.43, n.5, 2006. Disponível em: http://www.revistasusp.sibi.usp.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962006000500007&lng=pt&nrm=iso.

Seneda MM, Blaschi W, Rubin KCP, Lisboa LA. Aspiração folicular *in vivo*: metodologias, eficiência e sequelas. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. Anais. Belo Horizonte: CBRA, 2005. CD-ROM.

Shulman A, Ben-Nun I, Ghetler Y, Kaneti H, Shilon M, Beyth Y. Relationship between embryo morphology and implantation rate after *in vitro* fertilization treatment in conception cycles. *Fertil Steril*, v.60, p.123-126, 1993.

Spano AA, Silva AAMR. Níveis plasmáticos de progesterona durante o ciclo estral e na fase inicial da gestação em bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*). *Ars Vet*, v.8, p.131-141, 1992.

Spell AR, Beal WE, Corah LR, Lamb GC. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, v.56, p.287-97, 2001.

Thatcher WW, Guzeloglu A, Mattos R, Binelli M, Hansen TR, Pru JK. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology*, v.56, p.1435-1450, 2001.

Varago FC, Mendonça LF, Lagares MA. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Rev Bras Reprod Anim*, v.32, p.100-109, 2008.

Viana JHM. Avaliação ultrassonográfica de estruturas ovarianas em doadoras e receptoras de embrião. 1996. 120f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1996.

Viana JHM. Produção de embriões bovinos *in vivo* (transferência de embriões - TE) e *in vitro* (Fecundação *in vitro* FIV) no Brasil: histórico, cenário atual e perspectivas. In: Simpósio de Reprodução de Bovinos, 1, 2008, Pelotas, RS. Anais... Pelotas: EMBRAPA, 2008. p.48-55.

Vieira RC, Franco RVR, Diniz EG, Jacomini JO. Relação entre a morfologia do corpo lúteo e índices de prenhez em receptoras de embriões bovinos. *Biosci J*, v.18, p.99-102, 2002.

Wright JM. Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality scores. In: Stringfellow DA, Seidel SM (Ed.). *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 3.ed. Savoy, IL: IETS, 1998. p.167-170.