



Avaliação de receptoras de embriões bovinos usando ultrassonografia modo-B e Doppler colorido

Selection of bovine embryo recipients using B-mode and color Doppler ultrasonography

Adalberto Hidulica Pipa Tambuleni, Cristiano Rodrigues Borges Guimarães, Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, Eduardo Ramos Oliveira, Miller Pereira Palhão, Jairo Pereira Neves[‡]

Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, MG, Brasil.

Resumo

Objetivou-se comparar o tamanho e o fluxo sanguíneo do corpo lúteo (CL) no momento da transferência embrionária com a taxa de prenhez de receptoras bovinas. Utilizou-se duzentas e sessenta e seis ($n = 266$) receptoras azebuadas previamente sincronizadas. O dia esperado para a ovulação foi considerado o D0 experimental. Sete dias após (D7), classificou-se os CL desses animais quanto ao tamanho (grande, médio ou pequeno) e ao fluxo sanguíneo (intenso, regular e baixo) por ultrassonografia em modo-B e Doppler. Posteriormente, os embriões foram transferidos. Após 23 dias (D30), realizou-se o diagnóstico gestacional. Comparou-se a taxa de prenhez pelo teste de qui-quadrado e probabilidades ($P < 0,05$) foram consideradas significativas. As análises foram processadas no programa SAS versão 9.4 (SAS University Edition, EUA). Não houve diferença ($P > 0,05$) nas taxas de prenhez quanto ao fluxo sanguíneo no DG30 (36,1%, 40% e 35,2%, respectivamente, para fluxo intenso, regular e baixo). Entretanto, receptoras com CL de tamanho médio apresentaram maior taxa de prenhez comparadas a receptoras com CL de tamanho pequeno (43,3% VS 17,6%, respectivamente; $P < 0,04$). Conclui-se que o tamanho do CL é mais importante que o fluxo sanguíneo em prever a taxa de prenhez. Entretanto, essa interpretação deve ser cuidadosa devido ao baixo número de receptoras transferidas com CL pequeno.

Palavras-chave: corpo lúteo, fluxo sanguíneo, transferência de embriões.

Abstract

The objective of this study was to compare the size and blood flow of the corpus luteum (CL) before embryo transfer with the pregnancy rate of bovine recipients. Previously synchronized crossbred recipients ($n = 266$) were used. The expected day for ovulation was considered the experimental D0. Seven days after (D7), the CL of these animals were classified according to size (large, medium or small) and blood flow (intense, regular and low) by B-mode and Doppler ultrasonography. Subsequently, the embryos were transferred. After 23 days (D30), the gestational diagnosis was performed. The pregnancy rate was compared using the chi-square test ($P < 0.05$). The analyzes were processed by the SAS software version 9.4 (SAS University Edition, USA). The recipients with intense, regular and low blood flow did not differ ($P > 0.05$) in the pregnancy rate observed in D30 (36.1%, 40% and 35.2%, respectively). Recipients with medium CL had higher pregnancy rate than animals with small CL (43.3% vs 17.6%, respectively; $P < 0.04$). Concluding that CL blood flow is not useful for the selection of recipients with a greater chance of becoming pregnant. However, CL size seems to be a good parameter to rule out animals with a lower chance of gestation.

Keywords: blood flow, corpus luteum, embryo transfer.

Introdução

O uso das tecnologias para produção de embriões vem crescendo notavelmente nos últimos anos no Brasil. Entretanto, sua aplicação ainda é pequena em vista do grande número de animais em idade reprodutiva aptos a receber um embrião.

O resultado final da taxa de prenhez está direto ou indiretamente correlacionado com todas as etapas de um programa de transferência de embriões (TE), desde a punção e recuperação dos ovócitos até a transferência do embrião para a receptora. Considerando situações ideais, seriam esperados resultados mais estáveis e promissores (Varago et al., 2008). Entretanto, a grande variabilidade destes resultados pode estar influenciando este cenário (Andrade et al., 2012).

Um dos fatores mais importantes para se determinar o uso de uma receptora é a presença e a qualidade do CL no dia da TE. Essa qualidade é tipicamente avaliada para seleção de receptoras através da palpação transretal ou pela ultrassonografia em modo-B para se determinar o tamanho do CL. Entretanto, estas estratégias podem resultar na transferência de embriões para um útero não receptivo com a presença de um CL pouco ou sem função, visto que, a funcionalidade luteal (secreção de P4) não pode ser acessada por estas avaliações (Pugliesi et al., 2017).

Neste contexto, associar avaliações do fluxo sanguíneo do CL por ultrassonografia Doppler a suas

[‡]Correspondência: jpneves@terra.com.br

Recebido: 22 de janeiro de 2019

Aceito: 29 de maio de 2019

características de tamanho poderia ser uma ferramenta ainda melhor para seleção desses animais e, portanto, proporcionar resultados mais promissores, minimizando custos e tornando os programas mais atrativos economicamente.

Nestas circunstâncias, objetivou-se avaliar o tamanho e o fluxo sanguíneo do corpo lúteo momentos antes da transferência de embriões e correlacionar estes parâmetros com a taxa de prenhez desses animais.

Materiais e métodos

Local e animais

O estudo foi conduzido no sul do Estado de Minas Gerais (Brasil). Foram utilizadas duzentas e sessenta e seis receptoras azebuadas ($n = 266$), com idade entre 2 e 5 anos e bom escore de condição corporal (ECC de $3,5 \pm 0,5$, escala de 1-5 (Edmonson et al., 1989) provenientes de um rebanho de receptoras da empresa Biotran LTDA (Alfenas, MG).

Os animais foram mantidos durante todo o experimento em pastagens predominantemente formadas por *Brachiaria decumbens* com sombreamento natural e fornecimento de água e mistura mineral vitaminada à vontade.

Todos os animais foram previamente submetidos a um manejo sanitário e apenas receptoras livres de Brucelose e Tuberculose e imunizadas contra IBR, BVD e leptospirose foram submetidas ao protocolo de transferência de embriões em tempo fixo (TETF). Esse experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade José do Rosário Vellano/protocolo CEUA-Unifenas 23 A/2012.

Delineamento experimental

Foi utilizado um único protocolo hormonal para todos os animais que teve início com a colocação de um implante intravaginal de progesterona (P4) (Primer® -Agener União – Brasil) e a aplicação intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) (Bimeda - Brasil) no início do protocolo. Oito dias após o implante de P4 foi retirado e foi procedida a aplicação intramuscular de 0,526 mg de cloprostenol sódico (PGF2 α) (Clocio®, Bimeda- Brasil), 300 UI de eCG (MSD Saúde Animal, Brasil) e 1 mg de cipionato de estradiol (CE) (Cipionato HC®, Hertape, Brasil). A ocorrência da maior parte das ovulações foi esperada para dez dias após o início do protocolo hormonal. Este dia foi considerado o D0 experimental (Fig. 1). A transferência dos embriões foi realizada no D7.

Por fim, o diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia em modo-B, 23 dias (DG30) após a TE por meio da visualização da vesícula embrionária e do embrião (Fig. 1)

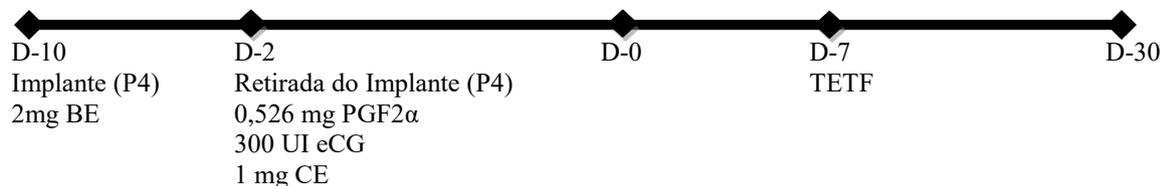


Figura 1. Linha do tempo das atividades experimentais

Transferência embrionária

Inicialmente as receptoras foram contidas em um brete convencional para facilitar a transferência de embriões e preservar a integridade física do animal e do técnico. A transferência foi por via transcervical após as receptoras serem avaliadas por ultrassonografia e receberem 4 mL de lidocaína 2% (Dorfin®, Hertape, Brasil) por via epidural com o intuito de diminuir as contrações do reto e proporcionar maior conforto para realização do procedimento.

A TE teve início com a prévia higienização da região da vulva com água e papel toalha. Com ajuda de um aplicador do tipo Hannover revestido com uma camisa sanitária o embrião foi introduzido até a vagina. Após a passagem do primeiro anel da cérvix, a camisa sanitária foi rompida e os demais anéis passados. Posteriormente, o aplicador foi direcionado ao corno uterino ipsilateral ao ovário com a presença de um CL, sendo o embrião depositado no terço final deste corno.

Os embriões utilizados foram produzidos pelo Laboratório de Produção *in vitro* da empresa Biotran LTDA. Tinham a mesma fase de desenvolvimento (Blastocisto) e apresentavam grau de qualidade I (Manual da IETS 4ª Edição, Stringfellow e Givens, 2010).

Avaliações ultrassonográficas

Anteriormente a TE, foi procedida a avaliação subjetiva de tamanho (CL-Pequeno, CL-Médio e CL-Grande, em modo B) e de fluxo sanguíneo (FS-Intenso, FS-Regular e FS-Baixo, em modo Doppler) do CL das receptoras (Siqueira et al., 2013; Guimarães et al., 2015; Silva et al., 2018; Fig. 2 e 3). As avaliações de tamanho e

fluxo sanguíneo foram, posteriormente, comparadas com o diagnóstico de gestação no D30. Apenas foram consideradas as vacas com a presença de um CL que receberam embrião. Receptoras que não ovularam ou que apresentavam CL sem fluxo sanguíneo ou com fluxo sanguíneo diminuto (Fig. 2), característico de estruturas em luteólise, não foram utilizadas. Receptoras que apresentaram 2 CL no mesmo ovário ou em ovários diferentes receberam embrião, no entanto, suas informações não foram incluídas nas análises estatísticas. As avaliações de tamanho e fluxo sanguíneo realizadas no dia da TE foram, posteriormente, comparadas ao diagnóstico de gestação no D30.

O exame foi procedido por meio de um aparelho ultrassonográfico de marca MINDRAY M5 acoplado a um transdutor de 7,5 MHz, com velocidade de 32 frames por segundo, potência de 100%, ganho de 58 e o ajuste da frequência de pulsos de 0,6 kHz (PRF = 0,6). A profundidade de trabalho em ambos modos ultrassonográficos foi de até 6,1 cm e o ponto focal de melhor definição a 2 cm do transdutor (Ginther, 2007).

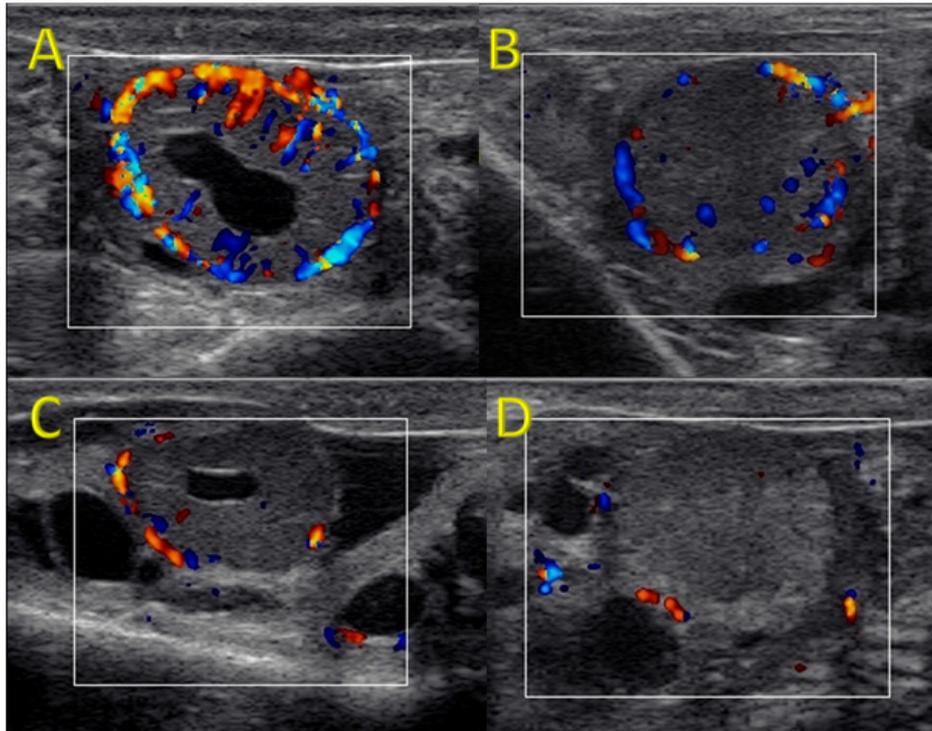


Figura 2. Avaliação ultrassonográfica do fluxo sanguíneo do corpo CL de receptoras de embriões bovinos no dia da inovulação (modo Doppler, MINDRAY M5). A) Fluxo sanguíneo intenso, B) Fluxo sanguíneo regular, C) Fluxo sanguíneo baixo e D) Fluxo sanguíneo diminuto característico de CL em luteólise.

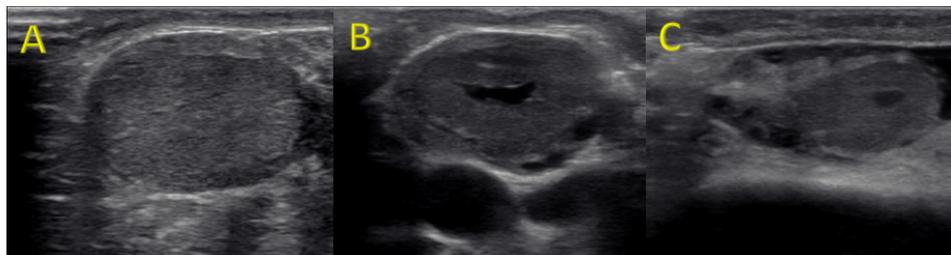


Figura 3. Avaliação ultrassonográfica do tamanho do corpo CL de receptoras de embriões bovinos no dia da inovulação (modo B, MINDRAY M5). A) CL grande, B) CL médio e C) CL pequeno.

Análises estatísticas

O modelo que explica a taxa de prenhez incluindo os efeitos de tamanho do CL, fluxo sanguíneo e a respectiva interação foi analisado pelo teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*. Tabelas de frequência de distribuição foram confeccionadas para a taxa de gestação, considerando-se os diversos fatores e a estatística de qui-quadrado para julgar as diferenças estatísticas entre os níveis de cada fator (exemplo: comparar as taxas de gestação para os diferentes escores de fluxo sanguíneo do CL, avaliados no D7. Probabilidades estatísticas menores que ($P < 0,05$) foram consideradas significativas. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados no programa



SAS versão 9.4, acessado pela via virtual no SAS *University Edition*.

Resultados e discussão

A taxa geral de gestação observadas no D30 foi de 37,2% (99/266). O fluxo sanguíneo do CL observado no dia da TE, neste estudo, não interferiu ($P > 0,05$) na taxa de gestação observada posteriormente no D30 (Tab. 1). Desta forma, a intensidade do fluxo sanguíneo presente na estrutura lútea no momento da inovulação embrionária não se mostrou eficiente para seleção de receptoras de embrião bovino.

Tabela 1. Taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos de acordo com o fluxo sanguíneo e tamanho do CL avaliados no dia da transferência.

Avaliação do CL	n	Taxa de Prenhez (%)
Fluxo Sanguíneo		
Intenso	83	36,1a
Regular	95	40,0a
Baixo	88	35,2a
Tamanho		
Grande	159	35,8ab
Médio	90	43,3a
Pequeno	17	17,6b

Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ($P < 0,05$).

Palhão et al. (2013) analisando a área (mm^2) de cobertura da vascularização do CL de 165 receptoras anteriormente a TE, também não observaram correlação entre a taxa de prenhez das receptoras e a intensidade de fluxo sanguíneo presente em seu CL ($45.3 \pm 21.3 \text{ mm}^2$ e $47.5 \pm 24.5 \text{ mm}^2$ para animais diagnosticados como “gestantes” e “não gestantes”, respectivamente).

Em contrapartida, Penaffi et al. (2015) analisando a porcentagem de vascularização do CL momentos antes da inovulação de 43 receptoras de embrião conseguiram resultados satisfatórios. Para isso, os pesquisadores dividiram os animais em dois grupos. O primeiro, composto por receptoras que apresentavam uma cobertura de 0-40% de vascularização na estrutura do CL e o segundo grupo uma cobertura 41-100% e obtiveram taxas de gestação de 0% (0/12) e 48,4% (15/31), respectivamente.

Esta disparidade de resultados pode ter ocorrido pelo fato do último grupo, aparentemente, ter transferido embriões em todos os animais com a presença de um CL incluindo os com CL inativos. Animais assim foram considerados inaptos a receber um embrião e, conseqüentemente, não contabilizados neste estudo. Ressaltando o uso da ultrassonografia Doppler, neste caso, como ferramenta de seleção de receptoras aptas a receber um embrião e descarte das demais.

Entretanto, mais recentemente, Pugliesi et al. (2016) estudando o impacto do fluxo sanguíneo do CL momentos antes da TE de 329 receptoras bovinas observaram taxas de prenhez de 45,1%^B (37/82), 55,9%^{AB} (57/102) e 62,3%^A (38/61) ($P < 0,05$) em grupos de receptoras que apresentavam fluxo sanguíneo baixo ($< 40\%$), médio (45 a 50%) ou alto ($\geq 55\%$), respectivamente.

Ao que parece, acessar a vascularização presente no CL para seleção de receptoras bovinas é mais eficaz para o descarte de animais com presença de CL com fluxo sanguíneo diminuto e, por tanto, inativos. Julgar a funcionalidade do CL por diferentes intensidades de fluxo sanguíneo presentes em CL ativos, não se mostrou eficiente para seleção desses animais. No início do diestro, o tecido luteal ainda em desenvolvimento parece não sustentar as correlações entre a intensidade do fluxo sanguíneo de CL ativos e as concentrações de P4 no animal. (Lüttgenau et al., 2011).

A avaliação do tamanho do CL, por outro lado, influenciou ($P < 0,04$) na taxa de prenhez destes animais. Entretanto considerarmos a interpretação destes resultados cuidadosa pelo baixo número de receptoras transferidas que apresentavam um CL pequeno naquele momento (Tab. 1).

O exame do tamanho do CL para seleção de receptoras bovinas é motivo de controvérsias entre estudos há algum tempo. Entretanto, as metodologias utilizadas para especificar o tamanho da estrutura quase sempre são distintas e a maior ocorrência de CL cavitários, neste período, acentua a divergência metodológica das caracterizações do seu tamanho. Nogueira et al. (2012) em análise do diâmetro do CL de 152 receptoras de embriões observaram uma taxa de prenhez superior ($P < 0,05$) em animais que no dia da TE apresentavam CL maiores ($2,03 \pm 0,41 \text{ cm}$) em comparação a receptoras com CL menores neste mesmo dia ($1,86 \pm 0,34 \text{ cm}$).

Entretanto, outros estudos semelhantes não observaram correlações entre o tamanho do CL no dia da TE e a taxa de prenhez dos animais. Viera et al., 2002 relataram 58,4% (331/567), 59,4 % (336/566) 59,3% (271/457) ($P > 0,05$) de gestação para CL classificados por palpação transretal como pequenos, médios e grandes, respectivamente. Pinaffi et al. (2015) também não observaram diferença no tamanho de CL de receptoras que ficaram gestantes ou que não ficaram gestantes após a TE ($17,52 \pm 0,3 \text{ mm}$ e $17,17 \pm 0,3 \text{ mm}$ ($P = 0,21$) e $2,86 \pm 0,1 \text{ cm}^2$ e $2,74 \pm 0,1 \text{ cm}^2$ ($P = 0,07$), respectivamente).



O estabelecimento de uma gestação não depende somente do tamanho ou do fluxo sanguíneo presentes no CL, mas também das concentrações P4 produzidas por ele, da qualidade embrião transferido e dos mecanismos de reconhecimento materno para o estabelecimento de uma gestação. Estes últimos, talvez, até mais determinantes para o seu estabelecimento do que as próprias características do CL.

Concentrações anormais de P4 (muito baixas ou muito altas) parecem ser prejudiciais ao estabelecimento da gestação (Remsen e Roussel, 1982; Nogueira et al., 2004). Neste contexto, se analisarmos melhor, o exame do CL para seleção de receptoras bovinas deveria primeiro possibilitar estimar a produção de P4 necessária ao estabelecimento e manutenção da gestação. Acessar o nível de P4 momentos antes da TE tornaria mais eficiente e prático a triagem de receptoras bovinas aptas a receber um embrião (Siqueira et al., 2012).

Conclusão

Conclui-se que a avaliação do fluxo sanguíneo do CL no dia da TE não se mostrou eficaz em selecionar receptoras com maiores chances de se tornarem gestantes. Por outro lado, a seleção de receptoras baseada no tamanho do CL pode ser um parâmetro eficiente para descartar receptoras com CL pequeno e, conseqüentemente, menor chance de gestação. Essa interpretação deve ser vista com cautela devido ao baixo número de receptoras transferidas que apresentavam CL de tamanho pequeno.

Agradecimento

À empresa Biotran, por todo apoio material e financeiro. À FAPEMIG pelo suporte financeiro.

Referências

- Andrade GA, Fernandes MA, Knychala, RM, Pereira Junior MV.** Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Rev Bras Reprod Anim, v.36, p.66-69, 2012.
- Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G.** A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. J Dairy Sci, v.72, p.68-78, 1989.
- Ginther OJ.** Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color-Doppler Ultrasonography. Book 4. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, p.258, 2007.
- Guimarães CRB, Oliveira ME, Rossi JR, Fernandes CAC, Viana JHM, Palhão MP.** Corpus luteum blood flow evaluation on Day 21 to improve the management of embryo recipient herds. Theriogenology, v.84, p.237-241, 2015.
- Lüttgenau J, Ulbrich SE, Beindorff N, Honnens A, Herzog K, Bollwein H.** Plasma progesterone concentrations in the mid-luteal phase are dependent on luteal size, but independent of luteal blood flow and gene expression in lactating dairy cows. Anim Reprod Sci, v.125, p.20-29, 2011.
- Nogueira E, Cardoso GS, Junior HRM, Dias AM, Ítavo LCV, Borges JC.** Effect of breed and corpus luteum on pregnancy rate of bovine embryo recipients. Rev Bras Zootec, v.41, n.9, p.2129-2133, 2012.
- Nogueira MFG, Melo DS, Carvalho LM, Fuck EJ, Trinca LA, Barros CM.** Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2 α and eCG? Theriogenology, v.61, p.1283-90, 2004.
- Nogueira E, Cardoso GS; Junior HRM, Dias AM, Ítavo LCV, Borges JC.** Effect of breed and corpus luteum on pregnancy rate of bovine embryo recipients. Rev Bras Zootec, v.41, n.9, p.2129-2133, 2012.
- Palhão MP, Guimarães CRB, Fernandes CAC, Ferreira MEO, Seber MF, Reis WSM, Rossi JR, Viana JHM.** Ultrasound features of the corpus luteum on the day of transfer and pregnancy diagnosis of bovine recipients: preliminary results. Anim Reprod, v.10, n.3, p.627, 2013. (Resumo).
- Pinaffi FLV, Santos ES, Silva MG, Filho MM, Madureira EH, Silva LA.** Follicle and corpus luteum size and vascularity as predictors of fertility at time of artificial insemination and embryo transfer in beef cattle. Pesq Vet Bras, v.35, p.470-476, 2015.
- Pugliesi G, Silva JCB, Nishimura T, Miyai D, Silva LA, Binelli M.** Use of Color-Doppler ultrasonography to improve selection of higher fertility beef recipient cows for embryo transfer. Anim Reprod, v.13, p.454, 2016. (Resumo).
- Pugliesi G, Rezende GR, Silva JCB, Lopes E, Nishimura TK, Baruselli PS, Madureira EH, Binelli M.** Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. Rev Bras Reprod Anim, v.41, p.140-150, 2017.
- Remsen LG, Roussel JD.** Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. Theriogenology;18:365-72. 1982
- Silva MAA, Rodrigues AS, Brandão TO, Maggitti Junior LDP, Carôso BSS, Chalhoub M, Bittencourt RF, Filho ALR.** Avaliação morfofuncional do corpo lúteo para diagnóstico precoce de gestação 20 dias após IATF em vacas mestiças leiteiras. Pesq Vet Bras, v.38, p.2006-2011, 2018.
- Siqueira LGB, Areas VS, Ghetti AM, Fonseca JF, Palhão MP, Fernandes CA, Viana JHM.** Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. J Dairy Sci,



v.96, p.6461-6472, 2013.

Siqueira LGB, Camargo LSA, Fonseca JF, Viana JHM. Evaluación de morfología, ecotextura y función del cuerpo luteo em programas de transferencia de embriones. *Spermova*, v.2, p.26-31, 2012.

Stringfellow DA, Givens, MD. Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS). 4th ed. ChampaignIL: IETS, 2010.

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.

Viera RC, Franco RVR, Diniz EG, Jacomani 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.
