

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS NA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL

Claudio Rocha
Luiz Ermandes Kozicki

ROCHA¹, C.; KOZICKI², L. E. Contribuição ao estudo da transferência de embriões em bovinos na região noroeste do Estado do Paraná. *Arq. ciênc. vet. zool. UNIPAR*, 1 (1): 29 – 34, 1998.

RESUMO: A pesquisa foi conduzida durante um período de dois anos, na Região Noroeste do Estado do Paraná, utilizando-se 19 animais da raça Holandesa preta e branca (HPB) e Simental. Em todos os animais foi realizado exame ginecológico completo e havia o acompanhamento diário de estro. O hormônio utilizado foi o Foliculo Estimulante (FSH). A colheita dos embriões foi sistematicamente realizada no 7º dia após a IA e a implantação dos embriões foi feita pela via transcervical. Em torno do 50º dia após a implantação dos embriões realizou-se o diagnóstico de gestação via palpação retal. Dos achados concluiu-se: houve elevado percentual de embriões viáveis em cada colheita (71,8%) e da taxa geral de prenhez (60,8%); os *Corpora lutea* das receptoras, classificados como bom e ótimo, renderam melhores taxas de prenhez (76,1 e 62,5% respectivamente) do que o tipo regular; houve maior número de ovulações no ovário direito em relação ao esquerdo; obteve-se melhores taxas de gestação quando o dia do estro das receptoras ocorreu 1 ou 2 dias antes que o estro das doadoras, ou quando o estro aconteceu 1 ou 2 dias após o das doadoras; o estágio embrionário de blastocisto rendeu melhores taxas de prenhez que o estágio de mórula compacta; o grau de qualidade dos embriões (ótimo e bom) exerceu fortes influências na obtenção de melhores taxas de prenhez (70,5 e 61,1 % respectivamente).

PALAVRAS-CHAVE: Transferência de embrião, bovinos, Paraná, taxa de prenhez.

EMBRYO TRANSFER IN COWS ON THE NORTHWEST REGION OF STATE OF PARANÁ, BRAZIL

ROCHA¹, C.; KOZICKI², L. E. Embryo transfer in cows on the northwest region of State of Paraná. *Arq. ciênc. vet. zool. UNIPAR*, 1 (1): 29 – 34, 1998.

ABSTRACT: This research was carried for two years at the Norwest Region of Paraná State (Southern Brazil). Holstein and Simenthal cows were submitted to gynecological examinations and oestrus signs were observed daily. Follicule stimulating hormone (FSH) was used to stimulate the superovulation on the donors cows. Embryos collection took place systematically on the 7th day post-artificial insemination and the embryos implantation was carried transcervically. Gestation was diagnosed by rectal palpation on the 50th day. It was recovered 71.8% of the suitable embryos and the general conception ratio (CR) reached 60.8%. *Corpora lutea* (CL) from the recipient cows, classified good or very good attained a better CR (76.1 and 62.5% respectively) than the ones classified as regular (36.9%). The right ovary ovulated more than the left; the CR was better when the occurrence of oestrus in recipients took place 1 to 2 days before the donors oestrus, or when the oestrus occurred 1 to 2 days after those of the the donors. The blastocyst stage of development of the embryo at transfer had a better CR than the compact morula stage; the embryos quality (very good and good) had a strong influence on the CR (70.5 and 61.1%, respectively).

¹ Médico Veterinário Autônomo – Goioerê – Pr.

² Médico Veterinário, Mestre, Doutor, Professor de Reprodução Animal, Departamento de Medicina veterinária, Universidade Federal do Paraná – Curitiba.

KEY WORDS: Embryo transfer, cow, Parana State.

CONTRIBUICION A LA INVESTIGACION DEL TRASLADO DEL EMBRIÓN EN LAS VACAS EN LA REGION DEL PARANÁ, BRASIL

ROCHA¹, C.; KOZICKI², L. E. Contribuicion al investigacion del traslado del embrión en las vacas en la region del Paraná. *Arq. ciên. vet. zool. UNIPAR*, 1 (1): 29 – 34, 1998.

RESUMEN: Durante dos años, se llevó a cabo esta investigación en la región noroeste del Estado de Paraná (Sur de Brasil). Vacas Holstein y Simenthal se sometieron a los exámenes ginecológicos y los signos de estro se observaron diariamente. Para la superovulación en las vacas donadoras se utilizó FSH. La colección de embriones tuvo lugar en el día 7 posterior a la inseminación artificial y la implantación de los embriones se realizó transcervical. En el día 50 se realizó el diagnóstico de gestación por palpación rectal. Las conclusiones fueron: se recuperó 71,8% de los embriones convenientes y el rango de concepción general (CR) alcanzó 60,8%. El cuerpo luteo (CL) de las vacas de los destinatarios, clasificado como bueno y muy bueno consiguieron un CR mejor (76,1 y 62,5% respectivamente) que el regular (36,9%); el ovario derecho ovuló más que el izquierdo; el CR fue mejor cuando la ocurrencia de estro en los destinatarios tuvo lugar 1 o 2 días antes que el estro de los donadores, o cuando los estro ocurrieron 1 o 2 días después de aquéllos de los donadores; los embriones transplantados como blastocistos se organizaron mejor, teniendo un mejor CR que aquellos en fase de mórula compacta; la calidad de los embriones (muy bueno y bueno) tuvo una influencia fuerte en el CR (70,5 y 61,1%, respectivamente).

PALABRAS-CLAVE: Transferencia de embriones, vaca, Estado de Paraná.

Introdução

Considerável quantidade de pesquisas têm sido publicadas na área da transferência embrionária a partir dos momentos em que essa biotécnica da reprodução deixou de ser pesquisa básica laboratorial e passou a ser fortemente difundida, assimilada e empregada entre os interessados. Diversos profissionais brasileiros na década de 70 deram o maior do seu empenho trazendo ao Brasil a técnica recém desenvolvida. A partir desse ponto os profissionais e criadores passaram a empregá-la fortemente na obtenção progressiva de melhores animais geneticamente bem dotados.

Revisão de Literatura

Recentemente ALVAREZ *et al.* (1997), relataram índice de 53,8% de recuperação embrionária após lavagem uterina, obtendo a média de 8,5 estruturas em cada colheita. SILVA & OLIVEIRA (1997) em significativo número de dados, realizaram 1609 colheitas de embrião, recolhendo 12802 estruturas embrionárias, sendo 7768 viáveis, tendo como média 4,8 embriões

viáveis por colheita e percentual de 60,6% de prenhez. LANGE & REICHENBACH (1997) relataram semelhantes resultados aos dos pesquisadores supracitados relativo a embriões viáveis. BARROS & NOGUEIRA (1997) e FREITAS *et al.* (1997), obtiveram em média, respectivamente 10,0 e 8,7 embriões por colheita. Esses números obtidos a partir de dados brasileiros, inserem-se na média publicada por pesquisadores norte americanos, europeus e outros (CHAUHAN *et al.*, 1994; HÜHN *et al.*, 1994; PITURRU, 1994; AGARWAL *et al.*, 1995). Com base nesses dados, objetivou-se no presente trabalho, verificar a atual situação da transferência embrionária na região do arenito caiúá paranaense.

Material e Métodos

Os estudos sobre a transferência embrionária foram conduzidos na Região Noroeste do Estado do Paraná, utilizando-se 10 animais da raça Holandesa Preta e Branca (HPB) e nove animais da raça Simental, em um período de dois anos (1995-1997). Foram realizadas dezenove colheitas de embriões de vacas doadoras e utilizados

quarenta e seis animais receptores de porte médio. Do total de animais doadores 80,0% encontravam-se com escore da condição corporal entre 3,0 e 3,5 e 20,0% entre 2,0 e 2,5. As vacas doadoras de ambas as raças eram submetidas a pastoreio diário, sendo os piquetes constituídos pelas forrageiras: capim tanzânia, *coast cross* e *camerum*. Os animais doadores da raça HPB, em lactação, recebiam em torno de 7,0 kg de concentrado/dia/animal com 18,0% de proteína e mais silagem de milho *ad libitum*. A faixa etária dos animais doadores situou-se entre três e seis anos. O escore da condição corporal nos animais receptores girou em torno de 4,0, constituídos por novilhas HPB e meio sangue Simental/Charolesa.

Em todos os animais, foi realizado o exame ginecológico completo e com acompanhamento diário de estro. Os hormônios utilizados foram Pluset¹ e Foltropin²-V nas dosagens de 250 µg. O protocolo das dosagens diárias e o horário de administração obedeceu a recomendação dos Laboratórios. Nos animais receptores, o cloprostenol era aplicado em dose única de 500 µg no segundo dia após o início do período da superovulação. O sistema de colheita dos embriões obedeceu ao do tipo fechado, onde os cornos eram lavados com 400 a 500 ml de solução *buffer* fosfatada (PBS), no 7º dia após a Inseminação Artificial (IA). Imediatamente, após a lavagem uterina, os embriões eram procurados e avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento, obedecendo-se a classificação: MC = mórula compacta; BI = blastocisto inicial; BL = blastocisto; BEX = blastocisto em expansão; BLE = blastocisto expandido; e ao grau de qualidade determinado

pelos critérios: embrião nível 1 (ótimo); nível 2 (bom); nível 3 (regular). Uma vez os embriões separados em placas de *petri* menores, era adicionado o soro fetal bovino como meio de enriquecimento nutritivo.

A implantação dos embriões foi feita pela via transcervical, sendo um único embrião depositado no corno *ipsi lateral* (porção apical) ao que continha o corpo lúteo (CL). Imediatamente antes da implantação, os animais receptores eram palpados para verificação da presença, lado e qualidade do corpo lúteo, obedecendo aos critérios: CL1, CL2, CL3, respectivamente classificados como ótimo, bom e regular. De 45 a 60 dias após a implantação dos embriões, os animais receptores eram submetidos ao diagnóstico de gestação via palpação retal.

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos aos tratamentos estatísticos da média aritmética, desvio padrão e percentagem. No confronto entre duas percentagens utilizou-se o teste χ^2 segundo SFORZA (1974).

Resultados

Os dados gerais das transferências embrionárias estão expostos na Tabela 1 e os demais resultados encontram-se nas tabelas 2 e 3. Houve no total, 19 vacas doadoras submetidas ao processo de superovulação, sendo que três (15,8%) não responderam ao tratamento superovulatório.

Tabela 1. Parâmetros reprodutivos gerais levantados na transferência de embriões em bovinos na Região Noroeste do Estado do Paraná. (1995-1997).

Nº Colheitas	total emb. colhidos	total emb. viáveis	total emb. inovulados	total emb. congelados	total emb. desprezados	animais prenhes/colheita	taxa geral de gestação
16	96 (6,0±3,5)	71,8 % (4,6±3,3)	46,8 % (3,0±1,8)	28,1 % (2,1±1,0)	25,0 % (2,1±1,0)	1,75	60,8%

Números entre parêntesis representam a média e o desvio padrão por colheita realizada.
emb=embriões

¹ Pluset – Sero no Produtos Farmaceuticos Ltda, Barueri, SP.

² Foltropin – Leivas Leite S.^a Industrias Químicas e Biológicas, Pelotas, RS.

Tabela 2. Parâmetros reprodutivos obtidos na transferência de embriões tipo transcervical em bovinos na Região Noroeste do Estado do Paraná, entre os anos de 1995 e 1997. Dados em porcentagem (%).

Qualidade do CL das Receptoras CL1= ótimo CL2=bom CL3= regular	Gestação conforme a qualidade do Cl nas Receptoras	Frequência de CL nas receptoras R=lado direito L=lado esquerdo	Sincronização do Estro das R em relação às D	Gestação em relação à sincronização de estro entre R e D
CL1=36,9	41,1 ^c	R=63,0	E+2*=10,8	40,0 ^f
CL2=45,7 ^a	76,1 ^d	L=36,9	E+1=13,0	66,6
CL3=17,4 ^b	62,5 ^e		E+0=47,8	63,6 ^g
			E-1=13,0	50,0
			E-2=8,6	75,0 ^h

CL= corpo lúteo; R= receptoras; D= doadora; E=estro;

* E+2= E 2 dias após;

E+1= E 1 dia após;

E+0= E no mesmo dia;

E-1=E-1 dia antes;

E-2 dias antes

a:b= p>0,05

c:d= p<0,05

e:e= p>0,05

f:h= p>0,05

g:h= p>0,05

Tabela 3. Parâmetros reprodutivos obtidos na transferência de embriões tipo transcervical em bovinos na Região Noroeste do Estado do Paraná, entre os anos de 1995 e 1997. Dados em porcentagem (%).

Estágio de desenvolvimento do embrião na colheita	Gestação conforme o estágio de desenvolvimento do embrião	Grau de qualidade dos embriões na colheita	Gestação conforme grau de qualidade do embrião
MC*=52,1 ^a	54,1 ^d	G1=36,9	70,5
BI*=13,0 ^b	83,3 ^c	G2=39,1	61,1
BL*=4,3	-	G3=21,7	50,0
BEX*=23,9 ^c	72,7		
BLE*=6,5	66,6		

MC=mórula compacta; BI=blastocisto inicial; BL=blastocisto; BEX=blastocisto em expansão; BLE=blastocisto expandido

G1= ótimo;

G2= bom;

G3= regular

a:b= p<0,05

a:c= p>0,05

d:e= p>0,05

Discussão

Pela observação da tabela 1, pode-se verificar um elevado percentual de embriões viáveis recolhidos (71,8%), tendo em vista os achados de ROBERTS *et al.* (1994), e de CALLESEN *et al.* (1995), os quais obtiveram de 60,0 a 67,0 % respectivamente. Na presente pesquisa houve 4,6 embriões viáveis por colheita corroborando achados de LANGE & REICHENBACH (1997) e de SILVA & OLIVEIRA (1997). Igualmente os dados relativos a embriões desprezados por colheita e a taxa de prenhez de 60,8 % foram semelhantes aos de PITURRU (1994), FREITAS *et al.* (1997) e SILVA & OLIVEIRA (1997). Escassas são as referências a respeito da qualidade dos *Corpora lutea* dos animais receptores e sua relação com a taxa de prenhez. Clinicamente aponta-se como melhores ganhos de prenhez, quando o animal

receptor alberga corpo lúteo de ótima qualidade. Embora esse achado ovariano tenha peculiar subjetividade, na presente pesquisa os corpos lúteos classificados como bom e ótimo alcançaram significativamente melhores índices de prenhez, conforme pode-se observar na tabela 2, confirmando observações de DEMCZUK (1998, Comunicação pessoal), ao afirmar que nesse processo de transferência de embriões as receptoras executam fundamental função. A importância qualitativa do corpo lúteo das receptoras (THIBIER & NIBART, 1992) é enfatizada devido à manutenção da produção de progesterona até que haja a completa placentação embrionária.

A transferência de embriões requer a necessidade de se sincronizar o estro entre animais doadores e receptores e o período de sincronia entre esses animais não deve ultrapassar 24 horas, obtendo-se os melhores resultados quando ela se

fizer presente dentro de 12 horas (HAFEZ, 1995). Os dados contidos na tabela 2 demonstram que houve maior percentual de prenhez nas receptoras que entraram em estro um ou dois dias antes que as doadoras (E-1 e E-2) ao se confrontar com um ou dois dias após o estro da doadora (E+1 e E+2). Este achado poderia sinalizar maior período de preparo e produção trofoblástica endometrial (24 a 48 horas) para a recepção do embrião, proporcionando com isso melhores chances de desenvolvimento, devido talvez a maior concentração de leite uterino elaborado pelas glândulas endometriais sob ação progesterônica. Não houve diferença significativa na taxa de gestação entre os diversos dias, tomando se como ponto central o dia zero (dia do estro). Porém o melhor resultado foi o estro com dois dias antes ao da doadora. Nossos resultados aproximam-se aos de JANOWITZ (1994) no tocante aos dias E+2, E+0 e E-1, mas não são concordantes nos demais dias. Esse pesquisador obteve maior taxa de prenhez nas receptoras, quando o dia do estro de doadoras e receptoras foi coincidente, isto é E+0 (58,2%), contrastando com o desta pesquisa que foi o do dia E-2, atingindo o percentual de 75,0% de prenhez. KIM *et al.* (1992), igualmente relataram esses achados referindo-se aos dias E+1 (38,1% de prenhez) e E-1 (43,8%) elevando ainda mais as diferenças de nossas observações (66,6 e 50,0% de prenhez) nos dias em apreço. Face a não uniformidade e até mesmo as fortes discrepâncias dos resultados apresentados na literatura mundial quanto a essa característica, poder-se-ia supor que as diferenças existentes não só entre raças e rebanhos, como também entre indivíduos de um mesmo rebanho, revestir-se-iam de aspectos altamente relevantes. Nesse contexto, devem ser associados outros fatores muito importantes tais como qualidade e quantidade da alimentação, manejo dos animais, sanidade, idade, amamentação, clima, índices pluviométricos e outros, exercendo fortes influências sobre os parâmetros de sincronia de estro e a fertilidade propriamente dita. Segundo relatos de JANOWITZ (1994), o estágio de desenvolvimento do embrião tem um elevado significado sobre a taxa de prenhez, realçando-se o fator qualidade do embrião como fundamental. Na presente pesquisa, o estágio embrionário de blastocisto propiciou os mais elevados índices de prenhez quando comparados ao estágio de mórula

compacta. À exceção de blastocisto (BL), com somente duas estruturas existentes nesse grupo, todos os outros (BI, BEX, BLE) mostraram-se melhores ao conduzir a prenhez adiante, com taxas que se estenderam de 66,6 a 83,3% quando contrapostas ao estágio de mórula compacta. O grau de qualidade das estruturas observadas e o índice de gestação obtido nessa pesquisa, apontaram boa correlação (Tabela 3), ao mesmo tempo em que foram concordantes com os relatos encontrados na literatura (KIM *et al.* 1992; JANOWITZ, 1994). Os embriões classificados qualitativamente como ótimos e bons determinaram as melhores taxas de prenhez, respectivamente 70,5 e 61,1% de gestação, distanciando-se dos de regular qualidade com 50,0% de gestação.

Conclusões

Nas condições em que foi conduzida a pesquisa pode-se concluir:

- houve elevado percentual de embriões viáveis em cada colheita; a taxa geral de prenhez situou-se dentro dos parâmetros relatados na literatura;
- os *Corpora lutea* das receptoras, classificados como bom e ótimo, renderam melhores taxas de prenhez que o tipo regular; houve maior número de ovulações no ovário direito em relação ao esquerdo;
- no seu conjunto, quando o estro das receptoras ocorreu um ou dois dias antes do estro das doadoras, obteve-se melhores taxas de gestação, do que quando o estro aconteceu um ou dois dias após o das doadoras,
- genericamente, o estágio embrionário de blastocisto rendeu melhores taxas de prenhez que o estágio de mórula compacta;
- o grau e a qualidade dos embriões exerceu fortes influências na obtenção de melhores taxas de prenhez.

Referências Bibliográficas

- AGARWAL, S.K.; TANEJA, V.K.; YADAV, M.C.; SHANKAR, U. Influence of ovulation rate on recovery and quality of embryos in crossbred cattle. *Indian Journal of Dairy Science*, v.48, n.1, p.72-74, 1995.
- ALVAREZ, R.H.; CARVALHO, J.B.P.; ARRUDA, R.P.; OLIVEIRA FILHO, E.B. Resposta ovariana de vacas superovuladas: precisão do

- diagnóstico por palpação retal ou ultrasonografia. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 21, n.1, p.20-24, 1997.
- BARROS, B.J.P.; NOGUEIRA, M.F.G. Superovulação de doadoras da raça nelore utilizando 250 UI de FSH. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, Porto Alegre, v.25, n.1, p. 174, 1997 (Supl.)
- CALLESEN, H.; LOVENDAHL, P.; BAK, A.; GREVE, T. Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. *Journal of Animal Science*, v.73, n.6, p.1539-4, 1995.
- CHAUHAN, F.S.; SARVAIYA, N.P.; MEHTA, V.M. Superovulation encorne profile and recovery rate following treatment with FSH preparations in Jersey x Kankrej crossbred cows. *Indian Veterinary Journal*, v.71, p.991-5, 1994.
- DEMCZUK, E. Comunicação pessoal, 1998. Embrio-Sêmen Fertilidade e Planejamento Pecuário Ltda. Fone (044) 976-0034, Umuarama, Paraná.
- FREITAS, C.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A.; JUNQUEIRA, M.M. Desempenho de vacas gir na resposta superovulatória e produção de embriões. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, Porto Alegre, v.25, n.1, p.232, 1997 (Supl.)
- HAFEZ, E.S.E. Tecnologia reprodutiva assistida: manipulação da ovulação, fertilização *in vitro*/ transferência de embrião. In: HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. Manole Ltda : São Paulo, p.469-512, 1995.
- HÜHN, R.; KÖNIG, I.; ROMMEL, P. Behandlungsregimes und Behandlungszeitpunkte zur Superovulation beim Rind. *Archiv für Tierzucht*, v.37, n.5, p.509-17, 1994.
- JANOWITZ, U. Untersuchungen zu Einflussfaktoren auf den Transfererfolg bei Empfängern im Rahmen des Embryotransfers beim Rind. Unknown, Germany, 113 p., 1994 In: *Animal Breeding Abstracts*, v.63, n.6, p.402, Resumo 2826; 1995
- KIM, I.H.; SON, D.S.; LEE, K.W.; CHANG, I.H. Non-surgical transfer of fresh and frozen embryos of dairy cattle. *Korean Journal of Veterinary Research*, v.32, n.1, p.143-51, 1992.
- LANGE, H.; REICHENBACH, D. Bovine superovulatory treatments: follicle stimulating hormone (FSH) preparations and superovulation treatment protocols as sources of variation in embryo transfer practice. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, Porto Alegre, v.25, n.1, p. 127, 1997 (Supl.)
- PITURRU, P.G. *Embryotransfer bei Piemonteser-Rindern nach Superovulationseinleitung mit PMSG/Anti-PMSG sowie mit verschiedenen FSH-Präparaten unterschiedlicher Dosierung*. Hannover, 1994. 91p. Tese (Doutorado)- Tierärztliche Hochschule Hannover.
- ROBERTS, A.J.; GRIZZLE, J.M.; ECHTERNKAMP, S.E. Follicular development and superovulation response in cows administered multiple FSH injections early in the estrous cycle. *Theriogenology*, v.42, n.6, p.917-29, 1994.
- SFORZA, L.C. *Biometrie - Grundzuge biologisch-medizinischer Statistik*, Stuttgart : Gustav Fischer Verlag, 1974. 212 p.
- SILVA, R.C.P.; OLIVEIRA, J.M. Flushing, cryopreservation and bovine transfer at field conditions. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, Porto Alegre, v. 25, n.1, p. 147, 1997 (Supl.)
- THIBIER, M.; NIBART, M. Clinical aspects of embryo transfer in some domestic farm animals. *Animal Reproduction Science*, v.28, p.139-48, 1992.