

Influência do local de inovulação e do tamanho de corpo lúteo sobre a taxa de prenhez em programa de transferência de embriões bovinos em tempo fixo

(The influence of inoovulation site an size of the corpus luteum on pregnancy rate of heifers treated for fixed time embryo transfer)

A.B.C.M. Pessoa¹, E.T.N. Pereira², M.I.V. Melo^{3,4}

¹Veterinário Autônomo, Belo Horizonte, MG, Brasil.

²Fazenda Querença, Inhaúma, MG, Brasil.

³Departamento de Medicina Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, PUC Minas, Betim, MG, Brasil.

⁴Correspondência: bel.melo@terra.com.br

Resumo

O objetivo deste trabalho retrospectivo foi analisar o efeito do local de inovulação e do tamanho do corpo lúteo sobre a taxa de prenhez em novilhas receptoras de embriões produzidos *in vitro* (PIV). Analisaram-se 524 transferências de embriões PIV, sendo 371 oriundas de embriões frescos e 153 de embriões vitrificados em um programa de transferência em tempo fixo (TETF). A taxa de prenhez nas transferências em tempo fixo com embriões bovinos frescos foi maior do que com embriões vitrificados ($P < 0,05$). O local de inovulação no corno uterino e o tamanho do corpo lúteo não tiveram efeito sobre a taxa de prenhez em receptoras novilhas em programa de TETF ($P > 0,05$).

Palavras-chave: local de inovulação, tamanho de corpo lúteo, transferência de embriões em tempo fixo.

Abstract

The present study aimed to analyze the spot of inoovulation and the size of the corpus luteum effects in the pregnancy rate of heifers receiving in vitro produced embryos. The transfers of 524 crossbred heifers were evaluated in a fixed time transfer embryo program. The transfers 371 derived from fresh embryos and 153 of vitrified ones. The pregnancy rate were superior for fresh than vitrified embryo group ($P < 0,05$). The size of the corpus luteum (CL) and the local of inoovulation did not have significant effects on the pregnancy rate ($P > 0,5$) on neither fresh nor vitrified embryos.

Keywords: *fixed time embryo transfer, inoovulation site, size of the corpus luteum.*

Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) nos últimos anos é crescente em programas de melhoramento bovino, entretanto a proporção de embriões que atingem o estágio de blastocisto é, raramente, superior a 40% e os índices de gestação são em torno, também, de 40% (Neves et al., 2010).

Em bovinos, o conceito passa um período prolongado de tempo no lúmen uterino antes de se fixar ao endométrio. Perdas da gestação são caracterizadas tanto por morte embrionária precoce, que ocorre antes do período de manutenção do corpo lúteo (CL) ou no mesmo tempo de reconhecimento materno em vacas que estão nos dias 15-17 do ciclo, quanto por morte embrionária tardia, que ocorre da manutenção do CL ao fim da fase de diferenciação, em torno de 42 dias de gestação. Ovócitos anormais e/ou insuficiente suporte da tuba uterina ao embrião em desenvolvimento, provavelmente, contribuem para tais perdas. Depois de 50 dias de gestação, as perdas gestacionais são menos frequentes e caracterizam a morte fetal (Santos et al., 2004; Bridges, 2007). Uma proporção considerável de perdas acontece antes da eclosão do blastocisto. Perdas embrionárias adicionais, que podem ser atribuídas à disfunção uterina, ocorrem durante o alongamento e o período de fixação do conceito ao endométrio em bovinos (Bridges, 2007).

A técnica de TE habitualmente utilizada em bovinos está bem definida e consiste na inoovulação de um embrião no trato reprodutivo de uma fêmea receptora, previamente preparada, que irá completar a gestação. A maioria dos técnicos deposita o conceito no terço cranial do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo.

Existem poucos relatos sobre as taxas de prenhez em relação aos locais do corno uterino em que são inoovulados os embriões bem como sobre a existência ou não de diferença morfofuncional entre as regiões cranial, média ou caudal do corno uterino que possa favorecer ou comprometer a viabilidade do embrião. Pieroni (2009) avaliou as taxas de concepção após inoovulação nos terços cranial, médio e caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo. A autora concluiu que, tanto para embriões produzidos *in vivo* quanto para aqueles produzidos *in vitro*, o local de inoovulação, nas porções cranial, média ou caudal do corno uterino ipsilateral ao CL, não alterou as taxas de concepção das receptoras. Com esse estudo, concluiu também que, a morfologia dos três segmentos

dos cornos uterinos ipsilateral e contralateral ao corpo lúteo de novilhas abatidas, que simulavam uma receptora de embrião, mostrou-se semelhante à microscopia de luz e à de varredura eletrônica quanto a tipos celulares, apresentando menor vascularização no corno contralateral em comparação ao ipsilateral ao CL.

Beal et al. (1998) obtiveram maiores taxas de prenhez quando os embriões foram colocados no ápice do corno uterino, independentemente de qual dos cornos, esquerdo ou direito, e da qualidade do embrião.

Weems et al. (1989) indicaram que as concentrações de progesterona não são as mesmas dentro das regiões do corno uterino adjacente ao lado da ovulação, devido a uma distribuição local de P4 do CL para o ápice do corno uterino ipsilateral. As concentrações de progesterona foram maiores no tecido uterino da metade cranial do corno uterino até o ovário adjacente ao CL. A concentração de P4 não foi diferente nas metades cranial ou caudal do corno uterino oposto ao ovário com CL (Weems et al., 1988).

Alguns autores discutem se o tamanho do corpo lúteo (CL) tem efeito sobre a manutenção de uma gestação em bovinos. Segundo Bridges (2007), os níveis plasmáticos de P4 são influenciados por uma série de fatores, que não só o tamanho do CL.

Vasconcelos et al. (2001) observaram que os corpos lúteos que possuem maior área secretam maiores quantidades de P4, o que pode ter efeito positivo no reconhecimento materno da gestação e, conseqüentemente, na taxa de prenhez. Baruselli et al. (2003) constataram que a área do CL influenciou a concentração plasmática de progesterona (P4) e a taxa de concepção de receptoras de embrião bovino.

O desenvolvimento embrionário não parece ser devido a efeitos diretos da progesterona sobre o embrião, mas ao aumento da secreção de vários fatores voltados para o estímulo do desenvolvimento embrionário (histótrofo) desencadeado pela presença de altas concentrações de progesterona (Satterfield et al., 2006). Portanto, com base nestes autores, a manipulação das concentrações de progesterona, como no caso da alteração do tamanho e da qualidade do foliculo ovulatório e do CL subsequente, pode afetar diretamente a probabilidade de sobrevivência do embrião.

Dentro dessa linha de questionamento, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do local da inovação e o tamanho do corpo lúteo encontrados em receptoras no momento das transferências sobre as taxas de prenhez, utilizando-se embriões frescos e vitrificados em programa de transferência de embrião em tempo fixo.

Material e Métodos

No presente estudo retrospectivo, trabalhou-se com dados secundários de planilhas da Querença Empresa Rural Agricultura e Pecuária Ltda., situada no município de Inhaúma, MG, com registros de dezembro de 2012 a fevereiro de 2013.

Nesse período, foram realizadas cerca de 1700 transferências de embriões oriundos de oócitos aspirados de doadoras de variadas raças, manipulados e fertilizados com sêmen sexado, em laboratório de produção *in vitro* (PIV) na própria empresa Querença. Nesse protocolo, o laboratório encaminha os embriões frescos ou vitrificados com sete dias de cultivo, para serem transferidos para as receptoras previamente preparadas. No presente estudo, 524 transferências de embriões PIV foram analisadas, sendo 371 oriundas de embriões frescos e 153 de embriões vitrificados. Utilizaram-se, na construção da amostra, os seguintes critérios: dados somente de transferências realizadas em novilhas e dados de procedimentos realizados por um mesmo técnico, para minimizar esses possíveis efeitos sobre os resultados.

As receptoras, novilhas mestiças da raça Nelore, com graus de sangue semelhantes, foram mantidas em regime de pasto de boa qualidade, com água e sal mineral à vontade, e estavam em condição corporal 3,0, em uma escala de 1 a 5. Essas receptoras foram tratadas para TETF (transferência de embriões em tempo fixo) por meio do seguinte protocolo: inserção de implante vaginal CIDR + benzoato de estradiol i.m (dose), em dia aleatório do ciclo estral (D0); administração de 2,5ml de diniprost trometamina (Lutalyse®) i.m no D7; remoção do implante no D9 e administração de 0,3ml de cipionato de estradiol + 200UI de eCG (Novormon®) i.m. A TE ocorreu no dia 19 nas novilhas que apresentaram CL, seguindo-se protocolo adotado pela empresa.

Um dia antes da transferência, as receptoras foram examinadas por palpação transretal para a detecção e a classificação do corpo lúteo em: I-grande (≥ 16 mm), II- médio (>12 e <16 mm) e III- pequeno (≤ 12 mm).

No dia da transferência, nas receptoras que possuíam CL, procedeu-se à anestesia epidural no espaço sacrococcígeno para relaxamento da região pélvica, utilizando-se 3ml de cloridrato de lidocaína a 2%. Realizaram-se a limpeza da região perineal e o preparo do aplicador seguindo técnica de rotina. No momento da inovação, os embriões foram depositados nas porções cranial (ápice), média e caudal (base) do corno ipsilateral ao CL, as quais foram classificadas como ápice, porção média e base, acompanhando a facilidade da manipulação.

Os diagnósticos de gestação das receptoras foram realizados entre os dias 32 e 37 após o procedimento de TE (primeiro diagnóstico) e a confirmação da gestação entre os dias 60 e 70 (sexagem), ambos por exame ultrassonográfico. Foi considerado como resultado positivo o número de receptoras positivas no primeiro diagnóstico de gestação e na sexagem (segundo diagnóstico), e como resultado de diagnóstico negativo o



número de receptoras com resultados negativos no primeiro diagnóstico. Foi considerada perda gestacional quando os resultados foram positivos no primeiro diagnóstico e negativo na sexagem.

Foi realizada a estatística descritiva de taxas de prenhez e de morte embrionária. Todos os dados analisados foram de transferências realizadas no período de dezembro de 2012 a fevereiro de 2013, de uma mesma estação do ano, não sendo o mês do procedimento considerado na análise. Compararam-se o efeito do tipo de embrião (fresco ou vitrificado), o tamanho do corpo lúteo (graus I, II e III) e o local de inovação do embrião (ápice, porção média ou base) sobre a taxa de prenhez pelo teste qui-quadrado com nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

No presente estudo, 524 transferências de embriões PIV foram analisadas, sendo 371 oriundas de embriões frescos e 153 de embriões vitrificados. Maior ($P < 0,05$) taxa de prenhez foi observada após a transferência de embriões frescos, 47,16% (175/371), em relação a vitrificados, 35,29% (54/153). Rodrigues et al. (2007) compararam, retrospectivamente, as taxas de concepção de vacas Holandesas de alta produção submetidas à TE utilizando embriões frescos ($n = 2.634$) ou criopreservados ($n = 2.237$). Nesse trabalho, os autores relataram maior taxa de concepção ($P = 0,0013$) para embriões frescos (43,85%; 1.155/2634) do que para criopreservados (39,52%; 884/2.237), resultados semelhantes aos encontrados no presente experimento. Tal fato pode estar associado a injúrias provenientes da criopreservação desses embriões, conforme sugerido por Araújo et al. (2005). Estes autores relatam que a criopreservação compromete a viabilidade das células trofoblásticas e sua capacidade de secretar IFN- τ , devido aos efeitos osmóticos dos crioprotetores durante a desidratação e reidratação do embrião. Além disso, a ocorrência de fragmentações da membrana nuclear pode acarretar na deficiência da expressão do gene que codifica o IFN- τ , segundo os mesmos pesquisadores, interferindo no reconhecimento materno fetal da gestação (Araújo et al., 2005).

Do total de embriões transferidos, 24 perdas gestacionais foram constatadas entre o primeiro e segundo diagnósticos de gestação, não havendo, entretanto, diferença entre embriões frescos (9,3%; 18/371) e vitrificados (10%; 6/153). Tais perdas podem ser consideradas baixas se comparadas a trabalhos prévios nos quais foram relatadas perdas de 21,90% para embriões frescos (Vasconcelos et al., 2006) e de 26,20% para embriões descongelados (Sartori et al., 2006), bem como se comparadas ao estudo retrospectivo realizado por Baruselli et al. (2011), os quais utilizaram dados de vacas leiteiras de alta produção no Brasil e relataram perda gestacional entre 30 e 60 dias de gestação de 18,4% (outono; inverno) e 23,1% (primavera; verão).

Classificação do corpo lúteo por tamanho

O tamanho do corpo lúteo não teve efeito significativo sobre a taxa de prenhez ($P > 0,05$), tanto em embriões frescos como em vitrificados (Tab. 1), semelhantemente ao relatado por Pieroni (2009). Entretanto, alguns autores relatam que o maior diâmetro do folículo ovulatório também relaciona-se com o maior tamanho do corpo lúteo e, conseqüentemente, com elevada habilidade em manter a gestação (Lonergan et al., 2013; Ribeiro Filho et al, 2013).

Tabela 1. Efeito do tamanho do corpo lúteo sobre a taxa de prenhez em transferência de embriões frescos e vitrificados.

Qualidade do CL	Tipos de embrião	
	Vitrificados % (n/n)	Frescos % (n/n)
CL grau I (grande: ≥ 16 mm)	39,5% (32/81)	53,7% (102/190)
CL grau II (médio: >12 e <16 mm)	29,3% (12/41)	46,7% (42/99)
CL grau III (pequeno: ≤ 12 mm)	40,0% (10/25)	51,7% (31/64)

$P > 0,05$.

Local de inovação de embriões

O local de inovação não teve efeito significativo sobre a taxa de prenhez ($P > 0,05$) tanto em embriões frescos como em vitrificados (Tab. 2).

No total de 193 embriões frescos transferidos com o diagnóstico inicial de prenhez positivo até a confirmação com 60 dias, constatou-se que 18 (9,33%) resultaram em morte embrionária. Em um total de 60 embriões vitrificados transferidos, constatou-se que seis (10%) resultaram em morte embrionária. Observou-se



que o local de inovulação não teve efeito sobre a taxa de concepção e nem sobre as perdas gestacionais tanto em embriões frescos quanto vitrificados. Esses resultados estão de acordo com Pieroni (2009).

Tabela 2. Efeito do local de inovulação sobre a taxa de prenhez em transferência de embriões frescos e vitrificados.

Local no corno uterino	Tipos de embrião	
	Vitrificados % (n/n)	Frescos % (n/n)
Ápice	35,4% (35/99)	53,5% (115/215)
Porção média	41,9% (18/43)	43,6% (54/124)
Base	20,0% (1/5)	42,9% (6/14)

P > 0,05.

Em trabalho realizado com novilhas mestiças como receptoras, Fernandes (1999) relata que a inovulação no ápice do corno uterino resultou em maior taxa de prenhez, em se tratando de inovulação realizada no ápice quando a transposição da cérvix e a manipulação uterina eram de fácil execução.

Weems et al. (1989) indicaram que as concentrações de progesterona não são as mesmas dentro das regiões do corno uterino adjacente ao lado da ovulação, devido a uma distribuição local de P4 do CL para o ápice do corno uterino ipsilateral, o que pode influenciar na taxa de gestação ao se fazer a inovulação em diferentes partes do corno uterino. Entretanto, segundo Weems et al. (1988), a concentração de progesterona não é diferente nas metades cranial ou caudal do corno uterino oposto ao ovário com CL. Já Beal et al. (1998) observaram taxa de prenhez maior quando os embriões foram colocados no fundo do corno uterino independentemente de qual dos cornos, esquerdo ou direito, e da qualidade do embrião.

Conclusão

A taxa de prenhez nas transferências em tempo fixo realizadas com embriões bovinos frescos foi maior do que quando feitas com embriões vitrificados.

O local de inovulação no corno uterino não teve efeito sobre a taxa de prenhez em receptoras novilhas mestiças da raça Nelore em programa de TETF.

O tamanho do corpo lúteo não interferiu na taxa de prenhez em receptoras novilhas mestiças da raça Nelore em programa de TETF.

Referências

- Araújo MCC, Vale Filho VR, Ferreira AM, Sá WF, Barreto Filho JB, Camargo LSA, Serapião RV, Silva MVGB.** Secreção de interferon-tau em embriões bovinos produzidos *in vitro* frescos e congelados. Arq Bras Med Vet Zootec. v.57, p.751-756, 2005.
- Baruselli PS, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU, Sá Filho MF, Martins CM, Rodrigues CA, Bó GA.** Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. Theriogenology, v.76, p.1583-1589, 2011.
- Baruselli PS, Marques MO, Carvalho NAT, Berber RCA, Valentim R, Carvalho Filho AF, Costa Neto WP.** Dinâmica Folicular e taxa de prenhez em novilhas receptoras de embrião (*Bostaurus indicus* x *Bostaurus taurus*) tratadas com o protocolo "Ovsynch" para inovulação em tempo fixo. Braz J Vet Res Anim Sci, v.40, supl.,p.96-106, 2003.
- Beal WE, Hinshaw RH, Whitman SS.** Evaluating embryo freezing method and the site of embryo deposition on pregnancy rate in bovine embryo transfer. Theriogenology, v.49, p.241, 1998.
- Bridges GA.** Impact of preovulatory estradiol concentrations on mechanisms affecting fertility in cattle. Dissertation (Doctor of Philosophy) - School of the Ohio State University, OH, 2007.
- Fernandes CAC.** Inovulações não cirúrgicas e taxa de gestação de receptoras de embrião. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.51, n.3, p.263-266, 1999.
- Neves JP, Miranda KL, Tortorella RD.** Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. Rev Bras Zootec. v.39, p.414-421, 2010.
- Lonergan P, O'Hara L, Forde N.** Papel da progesterona do diestro na função endometrial e desenvolvimento do concepto em bovinos. Animal Reproduction, v.10, n. 3, p. 119-123, 2013.



- Pieron JSP.** Influência do local de inovação de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* sobre as taxas de concepção de fêmeas bovinas e sua relação com a morfologia uterina. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) -Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. 121f, 2009.
- Ribeiro Filho AL, Ferraz PA, Rodrigues AS, Bittencourt TCBS, Loiola MVG, Chalhoub M.** Diâmetro do foliculo no momento da inseminação artificial em tempo fixo e taxa de concepção em vacas Nelore. *Ciênc Anim Bras*, v.14, n.4, 2013.
- Rodrigues CA, Ayres H, Ferreira RM, Teixeira AA, Mancilha RF, Oliveira MEF, Souza AH, Baruselli, PS.** Taxa de concepção de embriões frescos e criopreservados transferidos em vacas Holandesas de alta produção. *Acta Sci Vet*, v.35, supl.3, p.1256, 2007.
- Santos JEP, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RLA, Galvão KN.** The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *J Anim Reprod Sci*. v.82/83, p.513-535, 2004.
- Sartori R, Gumen A, Guenther JN, Souza AH, Caraviello DZ, Wiltbank MC.** Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.65, p.1311-1321, 2006.
- Satterfield MC, Bazer FW, Spencer TE.** Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin15 (LGALS15) in the ovine uterus. *Biol Reprod*, v.75, p.289-296,2006.
- Vasconcelos JLM, Demétrio DGB, Santos RM, Chiari JR, Rodrigues CA, Sá Filho OG.** Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology*, v.65, p.192-200, 2006.
- Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC.** Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*.v.56, p.307-314, 2001.
- Weems CW, Lee CN, Weems YS, Vincent DL.** Distribution of progesterone to the uterus and associated vasculature of cattle. *Endocrinol Jpn*, v.35, p.625-630, 1988.
- Weems CW, Weems YS, Lee CN, Vincent DL.** Progesterone in uterine and arterial tissue and in jugular and uterine venous plasma of sheep. *Biol Reprod*, v.40, p.1-6, 1989.
-