

Qualidade Oocitária e Nível de Maturação de Embriões Nelore na Taxa de Gestação no Acre

Antônia Kaylyanne Pinheiro¹, José Marques Carneiro Junior², Francisco Aloísio Cavalcante³, Jean Paulo Gotelip Cabral⁴ e Helton Aparecido Garcia Gregianini⁵

¹Bióloga, doutoranda em Sanidade e Produção Animal, Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental, Rio Branco, AC.

²Zootecnista, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

³Médico-veterinário, mestre em Zootecnia, pesquisador da Embrapa Acre, Rio Branco, AC.

⁴Graduando de Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Acre, Rio Branco, AC.

⁵Médico-veterinário, mestre em Sanidade e Produção Animal, Rio Branco, AC.

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros de produção de oócitos, embriões e gestação em doadoras Nelore do Acre. Foram utilizados dados de dez fazendas entre 2015 e 2018, da empresa In Vitro Acre. Os oócitos foram coletados, por meio da técnica de aspiração transvaginal, e conduzidos a laboratório para maturação, fertilização e cultivo in vitro. Foi realizada estatística descritiva da produção de oócitos e embriões, utilizando o PROC MEANS e teste exato de Fisher no SAS. As proporções de oócitos para grau I, II, III e IV foram 4%, 12,34%, 61,03% e 22,63%, respectivamente. As proporções de embriões produzidos de acordo com o estágio de maturação foram: 462 (4,95%) mórula, 2.416 (21,47%) blastocisto inicial, 2.782 (24,62%) blastocisto, 5.624 (47,40%) blastocisto expandido, 185 (1,46%) blastocisto em eclosão e 8 (0,08%) blastocisto eclodido. Observou-se predominância do nível de maturação de blastocisto expandido, que conduziu às maiores taxas de gestação ($p < 0,05$). Concluiu-se que: a) há variabilidade da qualidade oocitária, dos níveis de maturação de embriões e das taxas de gestação, semelhante às observadas na literatura, demonstrando consolidação da técnica no Acre; b) o nível de maturação de blastocisto expandido foi predominante conduzindo às maiores taxas de gestação.

Termos para indexação: bovinos, doadora, produção in vitro de embriões.

Introdução

A pecuária de corte faz parte dos principais segmentos de produção econômica do Brasil, representado 8,5% do produto interno bruto (PIB) e 31% do PIB do setor do agronegócio brasileiro (Associação Brasileira de Indústrias Exportadoras de Carnes, 2019). O aumento da produtividade da pecuária nacional está relacionado à crescente inserção de tecnologias associadas ao manejo, nutrição e sanidade, ao uso de biotecnologias reprodutivas, que visam melhorar a eficiência na reprodução de animais de genética superior, encurtando o intervalo de gerações, resultando em benefícios econômicos ao produtor. As principais biotecnologias reprodutivas utilizadas são inseminação artificial em tempo fixo e produção in vitro de embriões. Dentre essas biotecnologias reprodutivas, a produção in vitro de embriões se destaca por proporcionar a disseminação genética de doadoras e reprodutores de alto padrão genético em curto período de tempo (Rodrigues; Rodrigues, 2009).

Contudo, a produção in vitro de embriões (Pive) é um processo longo que envolve várias etapas e sua eficiência é relativamente baixa quando comparada à produção in vivo. Na produção in vivo, 85% dos oócitos ovulados se desenvolvem até o embrião, enquanto na Pive apenas 30% se tornam embriões transferíveis (Mello et al., 2016; Rauber et al., 2003). A eficiência do uso comercial da Pive, em larga escala, está relacionada a melhorias nos protocolos laboratoriais, à redução de custos e ao aumento da produção de embriões. Vários fatores que interferem na eficiência da Pive, dentre eles a qualidade intracelular e a quantidade de células do *cumulus oophorus* presentes nos oócitos,

além do nível de maturidade dos embriões desenvolvidos (Rumpf, 2007). Nesse sentido o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade de oócitos aspirados e a influência do nível de maturidade dos embriões na taxa de gestação em bovinos da raça Nelore no Acre.

Material e métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso dos Animais da Universidade Federal do Acre (CEUA/Ufac nº 23107.028606/2018-54). Foram utilizados dados da produção de oócitos, embriões e gestações de animais da raça Nelore em dez fazendas no Acre nos anos de 2015 a 2018, fornecidos pela empresa In Vitro Acre. Durante esse período de avaliação, os dados resultaram em um total de 31.131 oócitos viáveis, 11.477 embriões e 3.527 gestações.

Os oócitos foram coletados de doadoras, por meio da técnica de aspiração folicular por via transvaginal guiada por ultrassonografia (ovum pick-up – OPU), e classificados em quatro graus de acordo com a qualidade intracelular e a quantidade de células do *cumulus oophorus*, conforme Gonçalves et al. (2008):

- a) Grau I – os oócitos apresentavam células do *cumulus* compactas, com mais de três camadas e possuíam ooplasma granulado, preenchendo a zona pelúcida.
- b) Grau II – os oócitos apresentavam células do *cumulus* compactas, com menos de três camadas e possuíam ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente.
- c) Grau III – os oócitos apresentavam células do *cumulus* expandidas e o ooplasma encontrava-se contraído com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida.
- d) Grau IV – os oócitos estavam totalmente descobertos ou parte deles, pelas células do *cumulus*, e o citoplasma possuía cor e granulações anormais.

Ao chegarem ao laboratório os oócitos foram maturados e fertilizados, sendo então cultivados. A classificação das estruturas coletadas foi realizada quanto ao estágio de desenvolvimento, conforme manual da Sociedade Internacional de Embriões (Robertson; Nelson, 1999), com exceção do estágio de blastocisto em eclosão (BN) que é metodologia do próprio laboratório.

- a) Mórula (MO) – estrutura com blastômeros ainda evidentes.
- b) Blastocisto inicial (BI) – estrutura que dá início a uma pequena cavidade denominada blastocele.
- c) Blastocisto (BL) – estrutura em que o blastocele aumenta de tamanho e ocupa a maior parte da zona pelúcida.
- d) Blastocisto expandido (BX) – a estrutura do blastocele aumenta de tamanho e ocorre uma redução na espessura da zona pelúcida.
- e) Blastocisto em eclosão (BN) – estrutura em início de rompimento da zona pelúcida.
- f) Blastocisto eclodido (BE) – estrutura com zona pelúcida rompida e embrião em contato direto com os tecidos maternos.

Após esse processo, iniciou-se a fase de inovulação a campo nas receptoras previamente selecionadas para receber o embrião.

Foi realizada análise estatística descritiva das variáveis de produção de oócitos e embriões, utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS Institute, 2002) por meio do procedimento PROC MEANS. Foi aplicado também teste exato de Fisher para verificação do efeito da qualidade embrionária na taxa de gestação das receptoras. Foram avaliadas: a) variáveis de oócitos: oócitos de grau I, II, III e IV; b) variáveis de embriões: mórula (MO), blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX), blastocisto em eclosão (BN) e blastocisto eclodido (BE).

Resultados e discussão

Na Tabela 1 estão descritas as médias, os respectivos desvios-padrões, valores mínimos e máximos e os percentuais de produção de oócitos de acordo com a qualidade morfológica entre os anos de 2015 a 2018.

Tabela 1. Médias (\bar{X}), desvios-padrões (DP), valores mínimos (mín.), valores máximos (máx.) e percentuais (%) de produção de oócitos de acordo com a qualidade morfológica.

Variável	\bar{X}	DP	Mín.	Máx.	%
Grau I	1,33	2,64	0	40	4,00
Grau II	3,81	4,32	0	43	12,34
Grau III	18,44	13,03	0	93	61,03
Grau IV	6,47	5,82	0	70	22,63

A produção total de oócitos viáveis para grau I foi de 1.554 (4%); grau II, 4.456 (12,34%); grau III, 21.559 (61,03%); e grau IV, 7.562 (22,63%). Observou-se grande variabilidade na Pive para produção de oócitos, apesar disso, esses resultados são condizentes com os obtidos na literatura, demonstrando que a técnica está consolidada no Acre.

Na Tabela 2 estão descritas as médias e os respectivos desvios-padrões, valores mínimos, valores máximos e percentuais de produção de embriões, de acordo com o estágio embrionário, entre os anos de 2015 a 2018.

Tabela 2. Médias (\bar{X}) e os respectivos desvios-padrões (DP), valores mínimos (mín.), valores máximos (máx.) e percentuais (%) de produção de embriões, de acordo com o estágio embrionário, entre os anos de 2015 a 2018.

Variável	\bar{X}	DP	Mín.	Máx.	%
Mórula (MO)	0,40	1,30	0	18	4,95
Blastocisto inicial (BI)	2,07	2,95	0	33	21,47
Blastocisto (BL)	2,38	3,09	0	26	24,62
Blastocisto expandido (BX)	4,81	5,53	0	60	47,40
Blastocisto em eclosão (BN)	0,16	0,96	0	13	1,46
Blastocisto eclodido (BE)	0,01	0,11	0	04	0,08

As proporções de embriões produzidos de acordo com o estágio de desenvolvimento foram: 462 (4,95%) mórula (MO), 2.416 (21,47%) blastocisto inicial (BI), 2.782 (24,62%) blastocisto (BL), 5.624 (47,40%) blastocisto expandido (BX), 185 (1,46%) blastocisto em eclosão (BN) e 8 (0,08%) blastocisto eclodido (BE). Observa-se a predominância de estágio de desenvolvimento embrionário de BX, semelhante aos encontrados na literatura em raça Zebuína e condizente com a fisiologia do animal.

Fonseca et al. (2001), ao avaliar o estágio de desenvolvimento de embriões coletados a partir de processos superovulatórios em Zebuínos, encontraram tendência de embriões em estágio de blastocistos. Os resultados observados para MO, BI, BL, BX e BE foram 3,7%, 16,3%, 37%, 42,2% e 0,7%, respectivamente. Da mesma forma, Neto et al. (2000), avaliando o desempenho em doadoras da raça Nelore, obtiveram resultados para MO, BI, BL e BX com valor de 20%, 41,2%, 28,94% e 2,69%, respectivamente.

Considerando os estádios de desenvolvimento do embrião, as porcentagens de gestação foram: 111 (26,98%) para MO, 474 (37,64%) para BI, 601 (37,44%) para BL, 825 (40,39%) para BX, 30 (35,56%) para BN e 5 (76,67%) para BE (Figura 1).

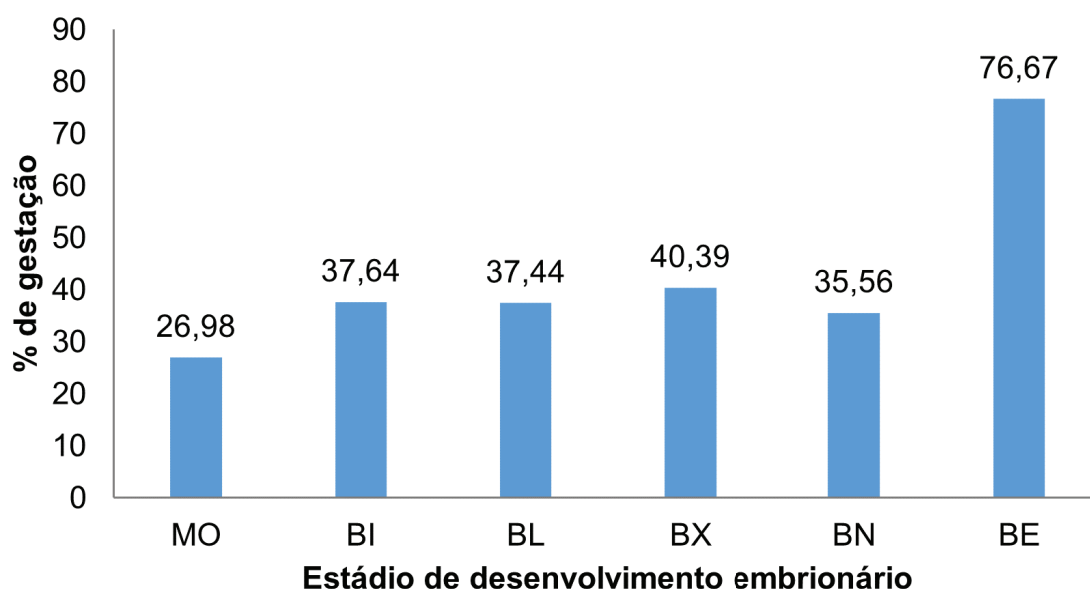


Figura 1. Porcentagem de gestação a partir de embriões transferidos de acordo com o estágio de desenvolvimento embrionário: mórula (MO), blastocisto inicial (BI), blastocisto (BL), blastocisto expandido (BX), blastocisto em eclosão (BN) e blastocisto eclodido (BE).

O tipo de desenvolvimento do embrião que apresentou melhor taxa de gestação foi o BE, com 76,67%, superior ao observado por Scanavez et al. (2013) de 47,1%. Segundo Jainudeen et al. (2004), estádios de desenvolvimento muito precoces ou tardios são afetados negativamente e resultam em baixos índices de gestação. Não é possível afirmar que o tipo de desenvolvimento de embrião BE conduza a uma maior porcentagem de conversão, pois o número de embriões para esse estágio foi baixo em comparação com os demais. Logo, esse resultado pode ter ocorrido por efeito estocástico.

Foram observadas taxas similares nas porcentagens de gestação para BI, BL, BX e BN. Entretanto, verificou-se efeito significativo ($p < 0,05$) pelo teste exato de Fisher, indicando que o estágio BX conduz a melhores taxas de gestação. Veloso Neto et al. (2014), quando analisaram taxa de gestação de acordo com o grau de desenvolvimento, observaram resultados para estádios iniciais (MO/BI) de 25% e para estádios avançados (BL/BX) de 57,14%. Da mesma forma, Scanavez et al. (2013) obtiveram taxa de gestação para estádios iniciais (MO/BI) de 50,6% e para estádios avançados (BL/BX) de 59,3%.

O estágio de desenvolvimento embrionário que apresentou menor taxa de gestação foi o MO ($p < 0,05$). Resultados semelhantes foram observados por outros autores (Neto et al., 2000; Fonseca et al., 2001; Pacheco et al., 2017). Segundo Pacheco et al. (2017), o estágio MO se encontra em desenvolvimento precoce quando comparado aos demais e sofre influência negativa, conduzindo a menores taxas de gestação em relação a estádios embrionários avançados.

Conclusões

Há variabilidade na Pive quanto à qualidade oocitária, níveis de maturação de embriões e taxas de gestação, semelhante às observadas na literatura, demonstrando a consolidação da técnica no Acre.

Em relação ao estágio de desenvolvimento do embrião há predominância de blastocisto expandido (BX), o qual conduz a maiores taxas de gestação.

Referências

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. **Beef report**: perfil da pecuária no Brasil 2019. São Paulo, 2019. 49 p.
- FONSECA, J. F.; SILVA FILHO, J. M.; PINTO NETO, A.; PALHARES, M. S. Estádios de desenvolvimento embrionário de vacas zebuínas superovuladas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6, p. 671-676, 2001.
- GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**: transferência e criopreservação de embriões bovinos. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 201-239.
- JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E. Indução da ovulação, produção e transferência de embriões In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 2004.
- MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira Animal**, v. 40, n. 2, p. 58-64, abr./jun. 2016.
- NETO, A. P.; SILVA FILHO, J. M.; FONSECA, J. F.; MOTA, M. F.; BELISÁRIO, H.; PARDINI, W. S.; ALVIM, M. T. T. Desempenho de vacas doadoras da raça Nelore em programa de transferência de embriões. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 3, n. 2, p. 167-173, ago./dez. 2000.
- PACHECO, S. L.; HOPPEN, A. R.; SOUZA, F. de S. Comparação da taxa de prenhez conforme o estágio de desenvolvimento de embriões produzidos in vitro e transferidos em bovinos de corte e leite. **Revista de Ciências Agroveterinárias e Alimentos**, n. 2, 2017.
- RAUBER, L. P.; ALVES, D. F.; FIGUEIRÓ, G. M.; BRUN, D. S.; HILGERT, T. F.; BERNARDI, M. L.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B. Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos mantidos em fluido folicular bovino de folículos de diferentes diâmetros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 3, p. 169-177, 2003.
- ROBERTSON, I.; NELSON, R. E. Certificação e identificação de embriões. In: STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**: um guia de procedimento e informação geral para uso da tecnologia de transferência de embriões, enfatizando precauções sanitárias. 3. ed. [Uberlândia]: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1999. p. 109-123.
- RODRIGUES, J. L.; RODRIGUES, B. A. Evolução da biotecnologia da reprodução no Brasil e seu papel no melhoramento genético. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p. 428-436, 2009.

RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 229-233, 2007. Suplemento.

SAS INSTITUTE. **User's guide**. Cary, NC, 2002. 525 p.

SCANAVEZ, A. L.; CAMPOS, C. C.; SANTOS, R. M. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 3, p. 722-728, 2013.

VELOSO NETO, H. F.; SILVA, J. C. F.; PEREIRA, L. C.; ANDRADE, J. C. O.; MOURA, M. T.; BARTOLOMEU, C. C.; LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A. L. Parâmetros que afetam a taxa de prenhez de receptoras bovinas de embriões produzidos in vitro. **Medicina Veterinária**, v. 8, n. 3, p. 31-35, 2014.