

# Uso do cultivo *overnight* na avaliação do potencial de desenvolvimento embrionário e como alternativa na logística da transferência a fresco de embriões F1 Holandês/Gir

Natana Chaves Rabelo, Alberto Mansur Ghetti, Luiz Sérgio de Almeida Camargo, Rui da Silva Verneque, João Henrique Moreira Viana

## Resumo

A transferência de embriões convencional ou simplesmente TE é uma ferramenta importante na formação de rebanhos mestiços F1. Frequentemente, contudo, doadoras e receptoras encontram-se em rebanhos diferentes, impossibilitando a coleta e transferência no mesmo dia. A congelamento dos embriões seria uma solução para esta questão, porém implica em aumento de custos e queda na eficiência do processo. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a possibilidade da manutenção de embriões F1 em cultivo "*overnight*" como estratégia para solucionar este problema de logística. Doadoras das raças Gir e Holandês foram submetidas à superovulação convencional e coletadas no dia 7 para transferência imediata dos embriões, ou no dia 6,5 para a transferência dos embriões após um período de 12h de incubação em meio CR2, em estufa de cultivo. Os embriões submetidos à incubação foram classificados quanto ao estágio de desenvolvimento no momento da coleta e re-classificados no momento da transferência. Não houve diferença significativa na taxa de gestação entre os embriões transferidos imediatamente ou após o cultivo (58,73% [37/63] vs. 52,50% [21/40];  $P > 0,05$ ) respectivamente. Nos embriões submetidos ao cultivo, observou-se uma variação maior do escore para evolução do estágio de desenvolvimento que para mudança de qualidade ( $1,23 \pm 0,17$  vs.  $0,18 \pm 0,09$ ;  $P < 0,0001$ ). Na avaliação da cinética embrionária foi encontrado maior escore para a evolução do estágio de desenvolvimento ( $1,57 \pm 0,21$  vs.  $0,84 \pm 0,23$ ;  $P < 0,05$ ), mas não para a qualidade ( $1,57 \pm 0,21$  vs.  $0,84 \pm 0,23$ ;  $P < 0,05$ ) nos embriões transferidos para receptoras posteriormente diagnosticadas como gestantes que para as não gestantes, respectivamente. O cultivo *overnight* de embriões mostrou ser uma alternativa viável para conciliar coletas e transferências em rebanhos diferentes, e pode ser utilizada como método de predição das taxas de gestação subseqüentes.

**Palavras-chave:** Bovinos, gestação, TE, superovulação.

## Use of overnight culture in the evaluation of embryo developmental potential and as an alternative in the logistic for transfer of fresh F1 Holstein/Gyr embryos

### Abstract

Conventional embryo transfer (ET) is an important tool for the establishment of crossbred F1 herds. Frequently, however, donors and recipients belong to different herds, and embryo flushing and transfer can not be performed at the same day. Embryo freezing could be a solution, but it increase costs and reduces efficiency of the process. This study aimed to evaluate the possibility of maintenance of F1 embryos in culture "*overnight*" as a strategy to minimize this problem. Holstein and Gyr donors were superovulated with conventional protocols and flushed at day 7 for immediate transfer of the embryos or flushed in day 6.5 and transfer of the embryos after overnight culture in CR2 medium, in incubator. Embryos kept in culture were evaluated for developmental stage and quality after recover and re-evaluated before transfer. There was no difference in pregnancy rate between embryos transferred immediately or after culture (58.73% [37/63] vs. 52.50% [21/40],  $P > 0.05$ ) respectively. In embryos cultured, there was a greater

variation of the average score of developmental stage progress than in the score for quality change ( $1.23 \pm 0.17$  vs.  $0.18 \pm 0.09$ ;  $P < 0.0001$ ). In the evaluation of embryo kinetics, higher scores developmental stage progress ( $1.57 \pm 0.21$  vs.  $0.84 \pm 0.23$ ;  $P < 0.05$ ) but not for quality ( $1.57 \pm 0.21$  vs.  $0.84 \pm 0.23$ ;  $P < 0.05$ ) were found in embryos transferred to recipients latter diagnosed as pregnant than to those diagnosed as not pregnant, respectively. The overnight culture of embryos proved to be an alternative to conciliate embryo collection and transfer procedures in different herds, and also a tool for predicting pregnancy rates.

**Key words:** Bovine, ET, pregnancy, superovulation.

## Introdução

Dentre as diferentes tecnologias de embriões, inclui-se a chamada “transferência de embriões convencional” (ou simplesmente TE), que é uma ferramenta de grande importância não apenas para a multiplicação de animais com genótipos superiores e otimização dos programas de melhoramento genético, como também para a produção de cruzamentos de interesse econômico. É o que pode-se observar em animais F1 Holandês-Zebu, cruzamento de grande interesse para a formação de rebanhos leiteiros, por apresentar um grau máximo de heterose, que é perdido pela utilização de cruzamentos alternados. Contudo, a aplicação de biotécnicas da reprodução em rebanhos leiteiros é limitada por diversos fatores, incluindo a menor escala e disponibilidade de receptoras, quando comparada aos rebanhos de corte. A criopreservação seria uma alternativa para este fator, mas as taxas obtidas em gestação subseqüentes são baixas, restringindo sua aplicação (VIANA & CAMARGO, 2007). Esta menor taxa de gestação de embriões congelados, quando comparada à obtida após a transferência a fresco, parece estar relacionada a danos na integridade da membrana e na estrutura interna das células inerentes ao processo de congelamento (HASLER, 2001). Uma possibilidade alternativa seria a centralização das coletas em um laboratório e a distribuição dos embriões em diferentes propriedades ou rebanhos, otimizando-se a relação oferta de embriões vs. disponibilidade de receptoras. No presente trabalho objetivou-se avaliar a possibilidade da manutenção de embriões F1 em cultivo “overnight” visando a transferência em rebanhos diferentes, e avaliar o desenvolvimento embrionário neste período como indicativo de potencial para estabelecimento de gestações.

## Material e Métodos

Vacas das raças Holandês Preto e Branco (HPB) e Gir foram utilizadas para a produção de embriões F1 (Holandês x Gir), em um esquema de cruzamento alternado. As doadoras foram mantidas nos Campos Experimentais de Coronel Pacheco (CECP) e Fazenda Santa Mônica (CEFSM), distantes em aproximadamente 200 km. As superovulações foram realizadas segundo o protocolo padrão de 8 aplicações de hormônio folículo estimulante (Pluset, Calier) em doses decrescentes, ajustadas em função do peso e idade de cada animal. O controle da concentração plasmática de progesterona foi realizado pelo uso associado de dispositivos intravaginais de liberação controlada (CIDR) e aplicação de drogas luteolíticas (Ciosin, Coopers). As doadoras foram inseminadas 12 e 24 horas após a manifestação de estro. Nas doadoras do CEFSM, a coleta foi realizada no sétimo dia após a IA, as estruturas recuperadas classificadas e os embriões viáveis ( $n = 63$ ) imediatamente transferidos a fresco para receptoras previamente sincronizadas. As doadoras mantidas no CECP foram coletadas no dia 6,5 (12 horas antes das doadoras do CEFSM), e os embriões viáveis recuperados ( $N = 40$ ) foram classificados e transportados em meio de manutenção (TQC Holding, Nutricell) para o Laboratório de Reprodução da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG, onde foram mantidos “overnight” em meio CR2 em estufa de cultivo. Na manhã seguinte, os embriões foram re-classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade (Figura 1 e 2) e transportados para o CEFSM, onde foram transferidos para receptoras seguindo os mesmos procedimentos das transferências de embriões coletados no local. O diagnóstico de gestação foi realizado aos 60 dias por palpação retal e/ou ultra-sonografia. Para análise estatística, foram atribuídos escores numéricos para os embriões em função da mudança de estádios de desenvolvimento (mórula, mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) e qualidade (I, II ou III). Diferenças no estágio de desenvolvimento e qualidade entre embriões que posteriormente resultaram em gestação ou não foram comparados pelo teste t. Taxas de gestação entre embriões mantidos em cultivo overnight ou transferidos após a coleta foram comparadas pelo método do X<sup>2</sup>. As análises foram realizadas com auxílio do Software SAEG.

## Resultados e Discussão

Não houve diferença na taxa de gestação entre embriões transferidos imediatamente após a coleta ou mantidos “overnight” em cultivo (58,73% [37/63] vs. 52,50% [21/40];  $P > 0,05$ ). Os valores obtidos foram próximos aos relatados por Freitas et al. (2004) para transferências a fresco utilizando os mesmos procedimentos padrão e no mesmo rebanho, e demonstram a viabilidade do uso do cultivo “overnight” como estratégia para viabilizar programas de produção e transferência de embriões F1 nos quais doadoras e receptoras encontram-se em rebanhos diferentes, evitando-se as perdas inerentes ao processo de criopreservação. Esta alternativa é particularmente importante em rebanhos leiteiros que usam animais F1, nos quais a disponibilidade de doadoras e receptoras nem sempre viabiliza o estabelecimento de um programa de TE exclusivo para a propriedade.

Após o cultivo “overnight” (Figura 1 e 2), observou-se uma variação maior do escore médio para evolução de estágio de desenvolvimento que para mudança de qualidade ( $1,23 \pm 0,17$  vs.  $0,18 \pm 0,09$ ;  $P < 0,0001$ ), demonstrando que o cultivo possibilitou a progressão do desenvolvimento embrionário sem alterações significativas na qualidade das estruturas. Quando a cinética embrionária foi avaliada em função das receptoras que posteriormente foram diagnosticadas como gestantes ou não gestantes, observou-se nas primeiras um maior escore para evolução de estágio de desenvolvimento ( $1,57 \pm 0,21$  vs.  $0,84 \pm 0,23$ ;  $P < 0,05$ ), mas não para qualidade ( $0,21 \pm 0,14$  vs.  $0,14 \pm 0,10$ ;  $P > 0,05$ ). Este resultado demonstra que a evolução do desenvolvimento embrionário em um período curto de cultivo (12h) está relacionada ao potencial de desenvolvimento do embrião e, conseqüentemente, às taxas de gestação subseqüentes. A antecipação do momento da coleta em 12h resultou em um elevado percentual (79,69%) de estruturas jovens (mórula e mórula compacta), e que estão justamente na fase de transição materno-zigótica. Desta forma, a classificação morfológica clássica poderia ser menos eficiente em estabelecer o potencial de desenvolvimento de um embrião que uma avaliação dinâmica, como a realizada no presente trabalho.

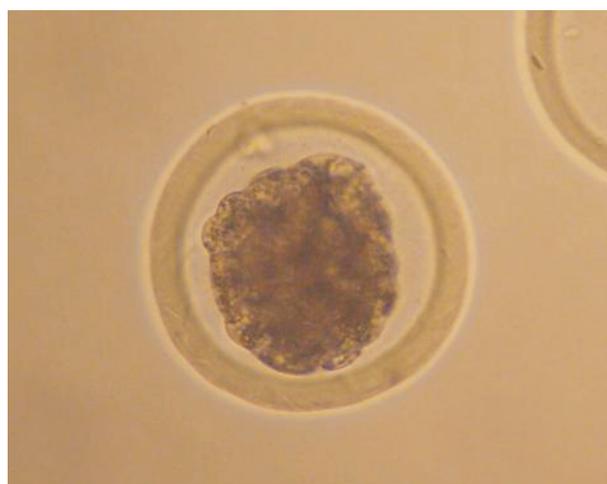


Figura 1. Embrião em fase de mórula 12 horas em estufa, já na fase de blastocisto.

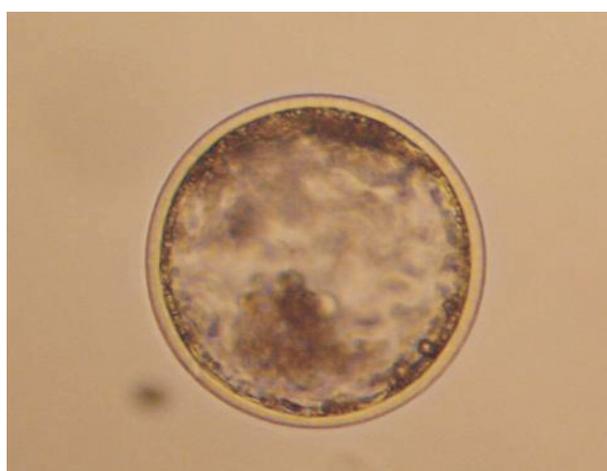


Figura 2. O mesmo embrião após o cultivo por compacta, classificado após a coleta.

## Conclusões

Concluiu-se que o cultivo “*overnight*” de embriões pode ser utilizado como estratégia para conciliar a logística de coletas e transferências em rebanhos diferentes sem o uso da criopreservação. A avaliação da evolução no desenvolvimento embrionário, neste período, pode também ser utilizada como parâmetro preditivo da taxa de gestação subsequente ou como ferramenta para seleção de embriões com maior potencial de desenvolvimento *in vivo*.

## Referências

FREITAS, C.; VIANA, J.H.M.; PALHÃO, M.P.; NOGUEIRA, L.A.G. Use of different animal categories as embryo recipients in bovines. In: 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro, BA. ICAR 2004 **Proceedings**, 2004. v.1. p.394-394.

HASLER J.F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1401–1415, 2001.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.915-919, 2007.