

EFICÁCIA DA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES A FRESCO ORIUNDOS DE BOVINOS DAS RAÇAS HOLANDESA E SIMENTAL

ALICIO MARTINS JÚNIOR
Pós-graduado

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

OZIEL BIZUTTI
Professor Titular

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

DOUGLAS BRASIL NOGUEIRA GAETI
Médico Veterinário

CONGEB - Congelamento e Transferência de Embriões
Ltda.

RENATO CAMPANARUT BARNABE
Professor Titular

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP

MARTINS JÚNIOR, A.; BIZUTTI, O.; GAETI, D.B.N.;
BARNABE, R.C. Eficácia da transferência de embriões
a fresco oriundos de bovinos das raças Holandesa e
Simental. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v.28,
n.1, p.89-92 1991.

RESUMO: Este trabalho foi conduzido com o propósito de se verificar a eficácia da transferência de embriões bovinos a fresco. Para tanto, vacas doadoras foram superovuladas a partir do 10^o dia do ciclo estral com FSH-P na dose de 40 ou 48 mg, via intramuscular, em duas doses diárias decrescentes, por quatro dias, seguida da administração de Cloprostenol no 12^o dia do ciclo e duas a três inseminações, a intervalos de 12 horas, quando no cio. Os embriões foram recuperados através de lavagem uterina no 7^o dia após o cio, sendo cada corno uterino lavado com 300 a 400 ml de Dulbecco modificado (PBS), enriquecido com 1% de soro fetal bovino. Após análise morfológica sob lupa estereoscópica, os embriões foram transferidos cirurgicamente, via incisão para-lombar, para o corno uterino de receptoras previamente selecionadas. Um total de 258 embriões, sendo 221 de doadoras da raça Holandesa e 37 da raça Simental, foram transferidos para 258 novilhas que, decorridos 45 a 60 dias da transferência, foram palpadas, por via retal, para constatação da prenhez. Foram observados, respectivamente, para embriões de vacas Holandesas e Simentais, 73,3% e 83,3% de gestações, diferença estatisticamente não significativa.

UNTERMOS: Transferência embrionária; Superovulação; Fertilidade, bovinos; Blastocisto

INTRODUÇÃO

O aumento da produção e produtividade animal não depende somente da melhoria nas condições de manejo dos animais (nutrição, medidas profiláticas, etc.) mas também, do aprimoramento genético, seja através da inseminação artificial ou, mais recentemente, da técnica de transferência de embriões.

Desde o pioneirismo de HEAPE¹¹, em 1891, com a transferência de embriões em coelha e, posteriormente, o sucesso obtido por WILLETT et al.¹⁹ (1951), trabalhando com a espécie bovina, muitos estudos têm sido conduzidos com a finalidade de se aprimorar a técnica da transferência de embriões bovinos no tocante à superovulação, colheita e transferência, seja através do método cirúrgico, seja através da técnica transcervical.

Neste sentido vários pesquisadores, utilizando as mais variadas técnicas de superovulação e de transferência, obtiveram diferentes resultados, como se segue: ROWSON et al.¹³ (1972) e ELSDEN et al.⁵ (1978), empregando o PMSG (pregnant mare serum gonadotrophin) e transferência cirúrgica obtiveram, respectivamente, 91,1% e 59% de prenhez; DONALDSON⁴ (1986); GARCIA et al.⁷ (1986); HASLER et al.¹⁰ (1987), com FSH (follicle stimulating hormone) e transferência cirúrgica conseguiram, respectivamente, 51%, 60% e 71,3%; já ALCIVAR et al.¹ (1984) e WALTON et al.¹⁷ (1986), empregando o FSH e transplante via transcervical, obtiveram 29% e 60% de gestações, respectivamente; no entanto, SREENAN¹⁵ (1982); TAKEDA et al.¹⁶ (1986); MAPLETOFT et al.¹² (1986); ETHERINGTON et al.⁶ (1986); GREGORY; RODRIGUES⁸ (1986) alcançaram, através de transferência cirúrgica, respectivamente, 79%, 55%, 77,1% e 48% de gestações; finalmente, SREENAN¹⁴ (1978); WRIGHT²⁰ (1981); WENKOFF¹⁸ (1986) conseguiram taxas de prenhez da ordem de 60%, 66% e 20 a 67% respectivamente.

O presente trabalho teve como finalidade verificar as taxas de prenhez obtidas quando se transferem, via cirúrgica, embriões a fresco, oriundos de bovinos das raças Holandesa e Simental.

MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi desenvolvido junto à CONGEB - Congelamento e Transferência de Embriões Ltda - localizada no Município de Botucatu, Estado de São Paulo. Foram utilizadas, como doadoras de embriões,

vacas das raças Holandesa e Simental, as quais foram mantidas em piquetes de Braquiária (*Brachiaria decumbens*) e Coast-cross (*Cynodon dactylon*). Além da alimentação por pastoreio, os animais receberam, ainda, 15 kg de capim Elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) triturado e 15 kg de silagem de milho (*Zea mays*) por dia.

As doadoras foram induzidas à superovulação a partir do 10^o dia do ciclo estral, onde cada animal recebeu 40 ou 48 mg de FSH-P* por via intramuscular, em duas doses diárias decrescentes, por 4 dias, de 7, 6, 4 e 3 mg (40 mg) ou 8, 7, 5 e 4 mg (48 mg), administradas pela manhã e à tarde. Para sincronizar o cio entre doadoras e receptoras, prostaglandina F₂ alfa análoga (cloprostenol)** foi administrada por via intramuscular, na dose de 0,53 mg, no 12^o dia do ciclo estral da doadora, enquanto que nas receptoras esta era efetuada durante a fase luteínica do ciclo, detectada através de palpação por via retal.

Inseminações foram efetuadas 48 horas após a aplicação da prostaglandina, sendo cada doadora inseminada 2 a 3 vezes com intervalos de 12 horas, dependendo da duração do cio. Os embriões foram colhidos através da técnica não cirúrgica, empregando-se um catéter***, segundo a técnica de BAUGARTNER et al.² (1977). Para a lavagem uterina foi utilizado o meio de Dulbecco modificado (PBS)****, enriquecido com 1% de soro fetal bovino aquecido a 36 °C.

Cada corno uterino foi lavado com 300 a 400 ml do meio de cultura e, após sifonagem, os embriões foram acondicionados em placas de Petri e, então, identificados e contados sob lupa estereoscópica com aumento de 16x e sua análise morfológica efetuada sob aumento de 70x.

Posteriormente os embriões foram colocados em placas de 30 mm de diâmetro, contendo PBS acrescido de 20% de soro fetal bovino, antes de serem transferidos. Com a finalidade de se prevenir eventual infecção, as receptoras receberam, por via intramuscular, 2g de sulfato de estreptomicina, 3.750.000 UI de penicilina G procaína e 1.250.000 UI de penicilina G potássica*****; para se obter um melhor relaxamento uterino receberam, ainda, 80 mg de N-butilbrometo de hioscina*****.

Os embriões foram transferidos cirurgicamente para o corno uterino mediante incisão no flanco "ipsilateral" ao ovário com corpo lúteo, segundo a técnica descrita por HAHN et al.⁹ (1977). Foram transferidos 258 embriões para o mesmo número de

novilhas receptoras, mestiças, previamente selecionadas, sendo 221 oriundos de vacas da raça Holandesa e 37 da raça Simental. O diagnóstico de gestação, por palpação retal, foi realizado decorridos 45 a 60 dias da transferência.

A análise estatística dos dados consistiu na aplicação do teste da diferença entre duas proporções com aproximação normal, segundo BERQUÓ et al.³ (1981). Fixou-se em 0,05 o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação do presente trabalho consistiu na verificação da relação entre o número de embriões transferidos a fresco, obtidos de vacas das raças Holandesa e Simental, e a frequência de sucesso de prenhez. Assim, os dados relativos às frequências observadas encontram-se reunidos na Tab. 1.

A Tab. 1 mostra o sucesso da transferência de embriões a fresco obtidos de doadoras das raças Holandesa e Simental.

Os resultados obtidos com embriões transferidos a fresco, isto é, logo após serem colhidos, mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre as taxas de prenhez das receptoras que receberam embriões das diferentes raças, através do método cirúrgico.

Utilizando transferência de embrião a fresco e FSH-P na dose de 40 ou 48 mg, obtivemos 74,8% de prenhez, resultado que se mostrou superior aos 59% relatados por ELSDEN et al.⁵ (1978) que utilizaram 32 mg de FSH-LH e aos 29% mencionados por ALCIVAR et al.¹ (1984). Também, foram mais elevados que os encontrados por DONALDSON⁴ (1986) que obteve 51% e aos 60% de prenhez relatados por WALTON et al.¹⁷ (1986). Resultados similares foram reportados por HASLER et al.¹⁰ (1987) que obtiveram 71,3% de gestações, utilizando doses variando de 26 a 50 mg de FSH. Nossos resultados se mostraram inferiores aos de ROWSON et al.¹³ (1972) que, utilizando o PMSG, obtiveram 91,1% de gestações.

A técnica de transferência cirúrgica descrita por HAHN et al.⁹ (1977) se mostrou eficiente em promover boas taxas de prenhez e nesse sentido, os resultados obtidos foram superiores aos relatados por MAPLETOFT et al.¹² (1986); GARCIA et al.⁷ (1986); GREGORY; RODRIGUES⁸ (1986) que mencionaram, respectivamente, 55%, 60% e 48% de gestações. Todavia, se mostraram inferiores aos 91,1% mencionados por ROWSON et al.¹³ (1972), mas dentro dos parâmetros encontrados por SREENAN¹⁵ (1982), o qual relatou taxas de prenhez variando de 46 a 87%.

* FSH-P - SCHERING - USA (5mg/ml)

** CIOSIN - COOPERS BRASIL S.A. (0,53mg/2ml)

*** NEUSTADT a.d. AISCH - GERMANY

**** PBS - CULTILAB

***** AGROVET 5.000.000 UI - SQUIBB IND. QUIM. S.A.

***** BUSCOPAN - BOEHRINGER & CIA LTDA

Nossos achados se situaram próximos daqueles encontrados por TAKEDA et al.¹⁶ (1986); ETHERINGTON et al.⁶ (1986); HASLER et al.¹⁰ (1987) que obtiveram, respectivamente, 79%, 77,1% e 71,3% de animais gestantes. Comparados aos dados obtidos através da técnica não cirúrgica, nossos resultados se mostraram superiores aos relatados por SREENAN¹⁴ (1978); WRIGHT²⁰ (1981); MAPLETOFT et al.¹² (1986); WALTON et al.¹⁷ (1986) que obtiveram, respectivamente, 60%, 66%, 55% e 60% de gestações. Entretanto, discordam dos dados de WENKOFF¹⁸ (1986) que obteve taxas de prenhez variando de 20 a 67%.

CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no presente experimento as seguintes conclusões podem ser auferidas:

- 1- não houve diferença significativa entre as taxas de prenhez quando se empregaram embriões a fresco, oriundos de vacas das raças Holandesa e Simmental;
- 2- as taxas de prenhez obtidas (73,3% e 83,8%) situaram-se num patamar bastante satisfatório;
- 3- o método cirúrgico empregado mostrou-se eficiente, pois promoveu altas taxas de prenhez.

AGRADECIMENTOS: Os autores agradecem à Central de Congelamento e Transferência de Embriões Ltda - CONGEB - por ter possibilitado a realização do presente trabalho.

MARTINS JÚNIOR, A.; BIZUTTI, O.; GAETI, D.B.N.; BARNABE, R.C. Holstein and Simmental fresh embryos transfer efficacy. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v.28, n.1, p.89-92, 1991.

SUMMARY: The efficacy of transferred fresh embryos was evaluated. Donors were superovulated on day 10 of the estrous cycle with 8, 7, 5 e 4 mg (48 mg) ou 7, 6, 4 e 3 mg (40 mg) of follicle stimulating hormone-pituitary (FSH-P) twice a day, during four days. Analogue prostaglandin (cloprostenol) was injected on day 12 of the cycle and inseminations with frozen semen two or three times were performed, each 12 hours. Nonsurgical recovery of the embryos was performed with "Neustad a. d. Aisch" catheter, introducing the medium into the uterine horns with syringes. The uterine horns were flushed with modified Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) enriched with 1% of foetal calf serum at 36 °C. After the

recovery, the embryos were morphologically evaluated under a stereomicroscope at 16x and 70x magnifications. The embryos transfers were surgically conducted through flank incision and pregnancy diagnosis made through rectal palpation on day 45-60 after transfer. Two hundred twenty one embryos from Holstein cows and thirty seven from Simmental were transferred to two hundred fifty eight cross bred heifers. Pregnancy rates for fresh embryo transfer from Holstein and Simmental cows were 73.3% and 83.3% the values were not statistically different.

UNITERMS: Embryo transfer; Superovulation; Fertility of bovine; Blastocyst

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01-ALCIVAR, A.A.; MAURER, R.R.; ANDERSON, L.L. Superovulatory responses in FSH or Pergonal treated heifers. *Theriogenology*, v.22, p.635-42, 1984.
- 02-BAUGARTNER, G.; HAHN, J.; SCHNEIDER, U. Erfahrungen mit der unblutigen Eigewinnung beim Rind. *Zuchthygiene*, v.12, p.39, 1977.
- 03-BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. *Bioestatística*. São Paulo, E.P.U., 1981.
- 04-DONALDSON, L.E. Day of embryo collection, quality and pregnancy rates in cattle. *Vet. Rec.*, v.118, p.661-3, 1986.
- 05-ELSDEN, R.P.; NELSON, L.D.; SEIDEL JUNIOR, G.E. Superovulation cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare serum gonadotrophin. *Theriogenology*, v.9. p.17-26, 1978.
- 06-ETHERINGTON, W.G.; KILMER, B.A.; BURKE, J.E.; MONTGOMERY, M.E.; WILSON, D.C. Pregnancy rates related to stage of estrous cycle at prostaglandin treatment in an embryo transfer recipient herd. *Theriogenology*, v.25, p.845-55, 1986.
- 07-GARCIA, M.A.; FAHNING, M.L.; GRAHAM, E.F. In vitro culture, freezing, thawing, and transfer of bovine embryos versus transfer of fresh embryos from the same collection; preliminary results. *Theriogenology*, v.26, p.803-13, 1986.

- 08-GREGORY, R.M.; RODRIGUES, J.L. Pregnancy rates after embryo transfer using drugs that produce relaxation of the uterus. *Theriogenology*, v.25, p.157, 1986.
- 09-HAHN, J.; SCHNEIDER, U.; ROMANOWSKI, W.; ROSELIUS, R. Ergebnisse der chirurgischen Eiübertragung am stehenden Rind. *Dtsch. tierärztl. Wschr.*, v.84, p.229-31, 1977.
- 10-HASLER, J.F.; McCAULEY, A.D.; LATHROP, W.F.; FOOTE, R.H. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rates in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, v.27, p.139-69, 1987.
- 11-HEAPE, 1891 apud BETHERIDGE, K.L. An historical look at embryo transfer. *J. Reprod. Fert.*, v.62, p.1-13, 1981.
- 12-MAPLETOFT, R.J.; LINDSELL, C.E.; PAWLYSHYN, V. Effects of clenbuterol, body condition and non-surgical embryo transfer equipment on pregnancy rates in bovine recipients. *Theriogenology*, v.25, p.172, 1986.
- 13-ROWSON, L.E.A.; LOWSON, R.A.S.; MOOR, R.M.; BAKER, A.A. Egg transfer in the cow: synchronization requirements. *J. Reprod. Fert.*, v.28, p.427-31, 1972.
- 14-SREENAN, J.M. Non-surgical embryo transfer in the cow. *Theriogenology*, v.9, p.69-83, 1978.
- 15-SREENAN, J.M. Current efficiency of embryo transfer technology and its role in cattle breeding. *Irish vet. J.*, v.36, p.138-44, 1982.
- 16-TAKEDA, T.; HALLOWELL, S.V.; McCAULEY, A.D.; HASLER, J.F. Pregnancy rates with intact and split bovine embryos transferred surgically and non-surgically. *Theriogenology*, v.25, p.204, 1986.
- 17-WALTON, J.S.; MARTINEAU, N.A.; STUBBINGS, R.B. Pregnancy rates in Holstein embryo transfer recipients: effect to treatment with progesterone or clenbuterol and natural versus induced cycles. *Theriogenology*, v.26, p.837-45, 1986.
- 18-WENKOFF, M. The effects of clenbuterol on pregnancy rates in bovine recipients after non-surgical transfers. *Theriogenology*, v.25, p.214, 1986.
- 19-WILLET, E.L.; BLACK, W.G.; CASIDA, L.E.; STONE, W.H.; BUCKNER, P.J. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science*, v.113, p.247, 1951.
- 20-WRIGHT, J.M. Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. *Theriogenology*, v.15, p.43, 1981.

Recebido para publicação em 12/11/90

Aprovado para publicação em 12/04/91

TABELA 1 - Dados relativos a raça das vacas doadoras, número de embriões a fresco transferidos e número percentual de prenhez obtida. Botucatu - SP, 1987.

raça da doadora	n ^o embriões transferidos	n ^o de prenhez (a fresco)	% prenhez
HOLANDESA	221	162	73,3
SIMENTAL	37	31	83,8
TOTAL	258	193	74,8