

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS PELOS MÉTODOS CIRÚRGICO E NÃO CIRÚRGICO¹

MARA I.B. RUBIN², C.P.D. COSTA³, C.S. PINTO³, J.L. RODRIGUES⁴,
R.M. GREGORY⁴, J. HAHN⁵ E CARLOS A.M. SILVA⁶

ABSTRACT.- Rubin M.I.B., Costa C.P.D., Pinto C.S., Rodrigues J.L., Gregory R.M., Hahn J. & Silva C.A.M. 1983. [Surgical and non-surgical embryo transfer in cattle.] Transferência de embriões em bovinos pelos métodos cirúrgico e não cirúrgico. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 3(4): 103-106. Depto Clínica de Grandes Animais, Univ. Fed. Santa Maria, Santa Maria, RS 97100, Brazil.

From October through December, 1980, a study of embryo transfer in cattle was carried out in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Twenty-five cows were used as donors. The breeds involved were Hereford (10), Aberdeen Angus (4), Normand (6) and Charolais (5). Forty cows Hereford Aberdeen Angus, Normand, Charolais and Holstein crosses were used as recipients. Oestrus synchronization and superovulation were obtained using prostaglandins alpha analogue and PMSG. Fourteen (56%) of the donors responded well to the superovulation treatment with PMSG, producing an average of 6.2 corpora lutea per animal. Thirty-eight embryos were collected by the non-surgical method, 29 of these being normal in development and its morphology normal. After 21 transfers using the surgical method 15 (71%) recipients became pregnant. Two out of 6 (33%) recipients treated by the non-surgical method sustained the pregnancy. It is concluded that the surgical method for bovine embryo transfer is still the most efficient. However, the need for rapid improvement in the non-surgical method is stressed, due to its simplicity and easy manipulation in the field.

INDEX TERMS: Bovine, embryo transfer.

SINOPSE.- Durante outubro e dezembro de 1980 foi desenvolvido um estudo na área de transferência de embriões em bovinos no Rio Grande do Sul. Como doadoras foram utilizadas 25 fêmeas das raças Hereford (10), Aberdeen-Angus (4), Normanda (6) e Charolesa (5). Para receptoras foram selecionadas vacas cruza Holandesa e das raças supracitadas. Obteve-se a sincronização do ciclo estral e superovulação através da aplicação de um análogo de prostaglandina⁷ F₂ alfa e de PMSG⁸. Das 25 vacas superovuladas 14 (56%) responderam ao tratamento com PMSG com uma média de 6,2 C.1./animal. Foram coleta-

dos 38 embriões pelo método não cirúrgico, sendo 29 (76%) com morfologia e desenvolvimento normais. Após 21 transferências pelo método cirúrgico, 15 (71%) receptoras resultaram gestantes; após 6 pelo não cirúrgico 2 (33%) receptoras mantiveram a gestação. Conclui-se ainda que o método de transferência cirúrgica é o mais eficiente e que há a necessidade de acelerar-se o aperfeiçoamento do método de transferência não cirúrgico em função da simplicidade e rapidez da manipulação para trabalhos a nível de campo.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Bovino, transferência de embrião.

¹ Aceito para publicação em 16 de maio de 1983.

Trabalho realizado com auxílio da GTZ (Genellschaft f. Technische Zusammenarbeit), Rep. Federal da Alemanha.

² Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Univ. Fed. Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS 97100.

³ Médico Veterinário autônomo, Clínica da Reprodução, Cruz Alta, RS 98100.

⁴ Depto de Clínica da Reprodução, Univ. Fed. Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90000.

⁵ Depto Biol. Exp., Klinik f. Geburtshilfe u. Gynaekologie des Rindes, Escola de Veterinária de Hannover, Bischofsholer Damm 15, D-3000-Hannover 1, Alemanha Ocidental.

⁶ Depto Clínica de Grandes Animais, Setor de Fisiopatologia da Reprodução, UFSM, Santa Maria, RS 97100.

⁷ CIOSIN, Cia. Imperial de Ind. Químicas do Brasil S.A.

⁸ INTERGONAN^R, VEMIE Veterinaer Chemie GmbH, Impfstoffwerk, D-4152 Kempen 1, Alemanha Ocidental.

INTRODUÇÃO

Com a técnica da inseminação artificial conseguiu-se multiplicar as possibilidades de transmissão dos caracteres de um único animal de alto padrão genético, permitindo um rápido incremento na qualidade do rebanho. Do lado feminino, porém, continuou fechada a chance de aumentar a potencialidade de produção que anda em torno de quatro bezerras por vida útil.

Com o advento da transferência de embriões em bovinos foi aberta essa possibilidade de aprimorar e multiplicar qualidades desejadas das matrizes.

Os primeiros produtos obtidos por transferência de embriões em bovinos foram resultado de tentativas feitas em 1951, por Willet et al., quando por meio do método cirúrgico foram colhidos óvulos fecundados de vaca, os quais também foram transferidos por via cirúrgica.

Averill et al. (1955) transferiram embriões de ovelhas ao oviduto de coelhas em diestro e conseguiram colher 50% deles, cinco dias após, em estado normal de desenvolvimento.

Os métodos utilizados em transferência de embriões tiveram grande desenvolvimento na última década e os conhecimentos adquiridos na área de colheita, cultivo, conservação e transferência permitem, atualmente, a utilização da técnica em escala comercial em alguns países da Europa e América do Norte. Através da técnica de transferência cirúrgica de embriões já se alcançaram em nosso país resultados semelhantes àqueles de países mais desenvolvidos (Rodrigues et al. 1980).

Para que se alcance a ovulação simultânea de muitos óvulos, utiliza-se hoje a técnica da superovulação. Para isso existem dois métodos básicos de tratamento: por um lado com gonadotropina sérica (PMSG) e por outro com hormônio folículo estimulante (FSH) (Hahn 1978). Muitos autores concordam que um único tratamento com 1500 a 3000 UI de PMSG ou o tratamento com um total de 25 a 50 mg de FSH-P, duas vezes ao dia durante cinco dias, trazem hoje excelentes resultados (Betteridge 1977, Foote & Onuma 1970, Hahn et al. 1976, Lamond 1974, Seidel et al. 1977, Sreenan & Beehan 1976). Hahn (1978) cita que o tratamento deve ser realizado no final da fase de corpo lúteo, mas que isso traria algumas dificuldades se fosse utilizado o ciclo estral natural. Para isso, foi simplificado o método anteriormente citado introduzindo-se o uso de prostaglandina (Tervit et al. 1973).

Planejou-se este programa de trabalho com o objetivo de testar, a nível de campo, a eficiência do método não cirúrgico para transferência de embriões, em comparação com a técnica já testada em nosso meio.

MATERIAL E MÉTODOS

As fêmeas doadoras e receptoras foram selecionadas e preparadas levando-se em consideração a história reprodutiva, o ciclo estral e a saúde genital. A seleção foi realizada em quatro propriedades situadas nos municípios de Uruguaiana (2), Camaquã (1) e São Gabriel (1), no Estado do Rio Grande do Sul. Como doadoras foram utilizadas 25 vacas das raças Hereford (10), Aberdeen-Angus (4), Normanda (6) e Charolesa (5), correspondendo essas raças aos grupos I, II, III e IV. Para receptoras foram selecionadas fêmeas cruza Holandesa e das raças supracitadas. Tanto as doadoras como as receptoras, com idade entre 3 e 12 anos, foram mantidas em regime de criação extensiva.

O ciclo estral das doadoras e receptoras foi sincronizado com dupla injeção de 500 mcg de um análogo de Prostaglandina F₂ alfa, com intervalo de 11 dias.

Os tratamentos utilizados seguiram os esquemas convencionais de superovulação (Hahn 1978, Seidel et al. 1977). Para obtenção da superovulação foram administradas 3000 UI de PMSG numa única injeção nove dias após o tratamento com um análogo de Prostaglandina F₂ alfa.

Dois dias após este tratamento foi aplicada a segunda dose de PGF₂ alfa. Ambas as drogas foram aplicadas por via intramuscular. Quarenta

e oito horas mais tarde foi realizado o controle do cio dos animais. Todas as doadoras que apresentaram cio foram inseminadas três vezes, com intervalos de 12 horas, utilizando-se sêmen congelado, enquanto que as receptoras que responderam ao tratamento do análogo de Prostaglandina aguardavam o momento da transferência.

Os embriões foram coletados entre o sexto e o sétimo dias após a inseminação pela lavagem do útero por via cervical (não cirúrgico), com cateter modelo Neustadt a.d. Aisch (Baumgartner et al. 1977), utilizando-se o meio Dulbecco's PBS modificado (Brand et al. 1977, Elsdén et al. 1976, Hahn et al. 1977).

Na Figura 1 pode-se observar esquematicamente a seqüência da metodologia de trabalho.

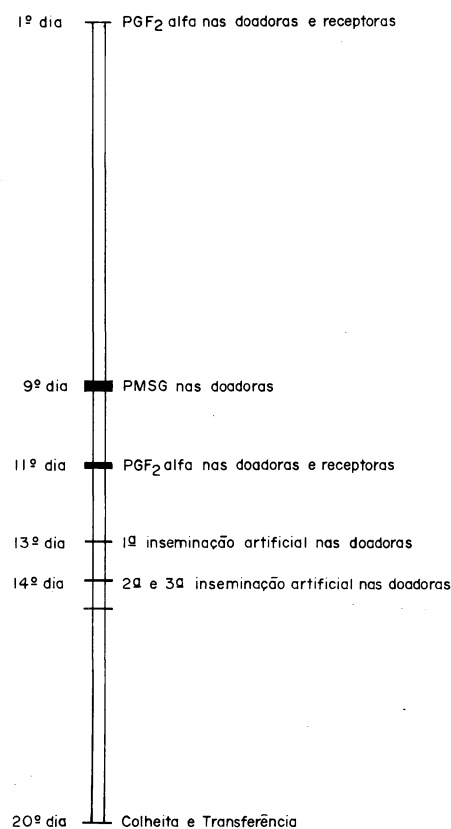


Fig. 1. Esquema de aplicação do análogo de PGF₂ alfa, do PMSG, da inseminação artificial, da colheita e da transferência dos embriões.

Após a colheita os embriões foram examinados microscopicamente e conservados em meio de cultivo (Dulbecco's PBS modificado com 20% de soro de feto bovino) à temperatura de 37°C até o momento da transferência.

Os embriões foram transferidos pelo método cirúrgico para a porção distal do corno uterino correspondente ao ovário contendo o corpo lúteo, após ter sido realizada a laparotomia no flanco do mesmo lado.

As transferências não cirúrgicas foram realizadas por via cervical, utilizando-se cateter metálico com ponta romba, procurando-se depositar o embrião na mesma porção do corno uterino em que foi colocado na transferência cirúrgica.

RESULTADOS

Observa-se no Quadro 1 o resultado do tratamento com PMSG para indução da superovulação nos quatro grupos de vacas doa-

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS

doras. Através do exame retal constatou-se que, em cada grupo, 50-66% (\bar{X} = 56%) das doadoras apresentaram reação positiva, isto é, dois ou mais corpos lúteos. Onze matrizes tratadas apresentaram apenas um corpo lúteo.

Os resultados individuais do tratamento para superovulação podem ser observados no Quadro 2. Através da contagem dos corpos lúteos em ambos os ovários por via retal, verifica-se que tanto o número de corpos amarelos como o de embriões colhidos variou muito em cada grupo e entre os grupos. No grupo I verifica-se uma média de 10,2 corpos lúteos por doadora (variação = 6 – 17), no grupo II, 3,5 (variação = 2 – 5), no grupo III, 4,2 (variação = 2 – 6) e no grupo IV, 4,0 (variação = 2 – 7). Nota-se, também, um maior número de embriões recuperados no grupo I (29), em contraste com os números dos grupos II

Quadro 1. Descrição das matrizes com reação positiva após tratamento com PMSG

Grupo	Matrizes tratadas	Matrizes com reação positiva ^(a)	
		Nº	%
I	10	5	50
II	4	2	50
III	6	4	66
IV	5	3	60
Total	25	14	56

(a) Sob reação positiva entende-se mais de duas ovulações.

Quadro 2. Descrição do aproveitamento dos embriões após colheita em relação ao número de corpos lúteos alcançados através da superovulação com PMSG

Grupo	Doadora	Nº de C.I./doadora	Nº de embriões colhidos	% de embriões recuperados	Nº de embriões transferidos
I	A	17	17	100	15
	B	10	3	30	3 ^(a)
	C	10	2	20	2 ^(a)
	D	8	3	37	3
	E	6	4	66	4
II	F	5	2	40	2
	G	2	2	100	–
III	H	5	4	80	–
	I	2	1	50	–
	J	6	3 ^(b)	50	–
	K	4	3 ^(b)	75	–
IV	L	7	–	–	–
	M	3	–	–	–
	N	2	–	–	–
Total	14	87	44	50	29

(a) Gêmeos.

(b) Óvulos.

Quadro 3. Descrição do número de embriões viáveis transferidos e do método de transferência em relação aos resultados do diagnóstico de gestação realizado sessenta dias após a transferência de embriões

Grupos	Número de embriões colhidos	Número de embriões transferidos	Número de receptoras	Resultados obtidos			
				Método cirúrgico		Método não cirúrgico	
				Transf. (a)	% Gest. (b)	Transf. (a)	% Gest. (b)
I (n = 10)	29	27 ^(a)	25	20	75,0	5	40,0
II (n = 4)	4	2	2	1	–	1	–
III (n = 6)	11	–	–	–	–	–	–
IV (n = 5)	–	–	–	–	–	–	–
Total (n = 25)	44	29	27	21	71,0	6	33,0

(a) Número de transferências realizadas.

(b) Percentagem de vacas gestantes após 60 dias da transferência.

(4), III (5) e IV (0), o que está diretamente relacionado com o resultado de superovulação. Das 44 estruturas recuperadas através da lavagem uterina de todas as doadoras, 38 eram embriões em diferentes fases de desenvolvimento, dos quais 29 eram viáveis para transferência. De cada uma das doadoras J e K foram recuperados três óvulos não fecundados. Verifica-se, ainda, que apenas 50% das estruturas esperadas foram recuperadas pela lavagem não cirúrgica do útero.

Conforme descrito no Quadro 3, 29 embriões viáveis foram transferidos para 27 receptoras, tendo duas delas recebido dois embriões cada uma. Nas 21 transferências realizadas pelo método cirúrgico foram utilizados 23 embriões, e nas transferências pelo método não cirúrgico, seis embriões.

Sessenta dias após as transferências foi efetuado o diagnóstico de gestação nas vacas receptoras. Quinze (71%) receptoras que receberam embriões pelo método cirúrgico encontravam-se gestantes e duas (33%) gestavam após transferência pelo método não cirúrgico.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A incidência de superovulação de 56% observada neste trabalho encontra-se em níveis superiores àqueles descritos por Hahn et al. (1976), Baumgartner et al. (1977), Betteridge (1977) e Brand et al. (1977). Esta diferença, provavelmente, fundamenta-se no reduzido número de matrizes avaliadas neste trabalho.

Após a indução da superovulação e verificação do número aproximado de ovulações por doadora, através da palpação retal, verifica-se que a percentagem de embriões recuperados (50%) se situa em índices semelhantes aos descritos por Alexander et al. (1976) e Elsdén et al. (1976).

O alto índice de aproveitamento alcançado após transferência pelo método cirúrgico – gestação em 71% das receptoras – coloca os resultados obtidos neste trabalho aproximadamente 10% acima dos obtidos por Screenan e Beehan (1976).

O índice de aproveitamento pelo método de transferência não cirúrgico resultou mais baixo que o do método cirúrgico. Porém os 33% de receptoras gestantes após transferência não cirúrgica estão equiparados aos resultados obtidos por Brand et al. (1976).

Levando-se em consideração os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a transferência de embriões pelo método cirúrgico a nível de fazenda pode ser utilizada na prática no Rio Grande do Sul, com um índice de manutenção de gestação em torno de 60%, o que se assemelha aos resultados obtidos noutros países mais desenvolvidos.

Embora a metodologia do método não cirúrgico em transferência de embriões seja mais simples, não se pode aconselhar seu uso na prática. Apesar do número reduzido de transferências realizadas por esse método neste trabalho, os resultados obtidos se equivalem aos descritos na literatura, o que nos permite fazer essa afirmação.

Deve-se, isso sim, continuar aprimorando a técnica de transferência de embriões pelo método não cirúrgico, a fim de colocá-la, no mais breve período de tempo possível, em nível

de aproveitamento compatível com o do método cirúrgico, o que ampliaria enormemente as possibilidades de disseminação deste sofisticado método de melhoramento zootécnico.

Agradecimentos. - Agradecemos sinceramente o apoio oferecido pela GTZ (Gesellschaft fuer Technische Zusammenarbeit), pelo CNPq e pelo Prof. Severo Salles de Barros (Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria), para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Alexander A.M., Markus A.N. & Hooton J.K. 1976. Non-surgical bovine embryo recovery. *Vet. Rec.* 99:221.
- Averill R.L.W., Adams C.E. & Rowson L.E.A. 1955. Transfer of mammalian ova between species. *Nature* 176: 167.
- Baumgartner G., Hahn J., Hahn R. & Schneider U. 1977. Erfahrungen mit der unblutigen Eigewinnung. *Zuchthyg.* 12:39.
- Betteridge K.J. 1977. Superovulation, p. 1-9. In: Betteridge K.J. (ed.) *Embryo transfer in farm animals. A review of techniques and applications.* Canada Department of Agriculture Monograph 16.
- Brand A., Aarts M.H., Zaayer D. & Oxender D. 1977. Recovery and transfer of embryos by non-surgical procedures in lactating dairy cattle. EEC, Conference "Control of Reproduction in the Cow", Galway, Sept. 27-30.
- Elsden R.P., Hasler J.F. & Seidel G.E. 1976. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenol.* 6: 523-532.
- Footo R.H. & Onuma H. 1970. Superovulation, ovum collection, culture and transfer. *A Review. J. Dairy Sci.* 53: 1681-1692.
- Hahn J. 1978. Die unblutige Eigewinnung beim Rind unter Beruecksichtigung der Vorbereitung der Spendertiere und der Entwicklung der Eizellen im Eileiter und Gebaermutter. *Dtsch. Tieraerztl. Wschr.* 85: 140-145.
- Hahn J., Hahn R., Luhmann F., Baumgartner G., Lorrman W. & Zoder H.F. 1976. Ergebnisse der Superovulation bei Faersen nach kombinierter PMSG/PGF₂ alpha-Behandlung. *Berl. Münch. Tieraerztl. Wschr.* 89: 89-93.
- Hahn J., Hahn R., Baumgartner G., Lotthammer K.H., Lorrman W., Schneider U., Traub J. & Zoder H.F. 1977. Untersuchungen zur Verbesserung der Auswahl von Spender - und Empfängertieren in Rahmen der Eiuebertragung beim Rind. *Zuchthyg.* 12: 68-76.
- Lamond D.R. 1974. Multiple births in cattle: An assessment. *Theriogenol.* 1: 181-212.
- Rodrigues J.L., Silva C.A.M., Hahn J., Rubin M.I.B., Costa C.D. & Pinto C.S. 1980. Viabilidade do emprego da transferência de embriões bovinos a nível de campo no Rio Grande do Sul, Brasil. *Revta Bras. Reprod. Anim.* 4 (3-4): 33-37.
- Seidel G.E., Elsdén R.P., Nelson L.D. & Bowen R.A. 1977. Superovulation of cattle with PMSG and FSH. EEC, Conference "Control of reproduction in the cow", Galway, Sept. 27-30.
- Screenan J.M. & Beehan D. 1976. Methods of induction of superovulation in the cow and transfer results, p. 19-34. In: Rowson L.E.A. (ed.) *Egg transfer in cattle.* Commission of the European Community, Luxembourg, Eur. 5491.
- Tervit H.R., Rowson L.E.A. & Brand A. 1973. Synchronization of oestrus in cattle using a Prostaglandin F₂ alpha-analogue (ICI-80996). *J. Reprod. Fertil.* 34: 179-181.
- Willet E.L., Black W.G., Casida L.E., Stone W.H. & Bruckner P.J. 1951. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science* 113:247.