

HUMBERTO FERNANDES VELOSO NETO

**EFEITO DA FLUNIXINA MEGLUMINA, SOMATOTROPINA  
RECOMBINANTE BOVINA E SINCRONIZAÇÃO DE  
RECEPTORAS SOBRE A TAXA DE PREENHEZ DE  
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

Recife

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

HUMBERTO FERNANDES VELOSO NETO

**EFEITO DA FLUNIXINA MEGLUMINA, SOMATOTROPINA  
RECOMBINANTE BOVINA E SINCRONIZAÇÃO DE  
RECEPTORAS SOBRE A TAXA DE PREENHEZ DE  
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

**Área de Concentração:** Biotecnologia da Reprodução.

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo Fernandes de Lima.

Recife

2013

Ficha Catalográfica

V342e Veloso Neto, Humberto Fernandes  
Efeito da flunixinina meglumina, somatotropina recombinante bovina e sincronização de receptoras sobre a taxa de prenhez de embriões bovinos produzidos *in vitro* / Humberto Fernandes Veloso Neto. -- Recife, 2013.  
51 f. : il.

Orientador (a): Paulo Fernandes de Lima.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2013.  
Referências.

1. FIV 2. Novilha 3. bST 4. Anti-inflamatório não esteroide  
5. Reprodução animal 6. Biotecnologia I. Lima, Paulo Fernandes de, Orientador II. Título

CDD 636.08926

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus, por me permitir viver este momento, e guiar meus caminhos.

À minha mãe (Lúcia de Fátima), pelo apoio incondicional, obrigado por ser um exemplo a ser seguido de dignidade e fé nessa grande batalha que se chama vida. Meus irmãos (Kim Rafael e Flávio), o que nos une vai muito além dos laços sanguíneos, obrigado pelas conversas e preocupações a mim dedicadas.

À minha Grande Família Veloso - Areolino Silva pelos momentos acolhedores. A felicidade só é real quando compartilhada.

Ao meu eterno orientador Prof. Paulo Fernandes de Lima, pelo conhecimento compartilhado desde os tempos de monitoria, não só a respeito da medicina veterinária, mas da vida, obrigado pelas oportunidades e pelas conversas amistosas.

Ao Prof. Marcos Antônio Lemos de Oliveira, obrigado pelos puxões de orelha, pela confiança e apoio, detentor de um coração enorme.

Ao Dr. Joaquim Correia, Dra. Bartira (Nordeste InVitro) e o Dr. Lucas Carvalho (Prenhez Positiva) pelo apoio para realização deste experimento, e ao Dr. Álvaro Machado Neto e a equipe da Fazenda Ocidental pela disposição dos animais.

À Dra. Joana D'arc, pela ajuda com a dissertação e o apoio, sempre batalhadora, ao Alcir Loureiro, com seu bom humor e sempre solícito, e D. Sônia, pelo carinho e todo cuidado com a minha pessoa, são amigos da área da Reprodução que sempre me ajudaram e me ouviram quando precisei, desde os tempos de monitoria.

À minha amiga Jeine Emanuele, pela ajuda com a estatística e pela paciência, uma pessoa de incomensurável grandeza.

Aos amigos pós-graduandos que convivi, e partilhei momentos inesquecíveis: Stephânia Katurchi, Joyci d'Paula, Vanessa Anny, Camila Cardoso, Fernanda Barbosa, Gabriela Borba, Renan Fagundes e Marcelo Araújo. Alguns mais próximos que outros, mas agradeço a todos e cada um sabe o porquê.

Enfim a todos que, de uma forma ou de outra, me ajudaram a concluir mais esta etapa.

*“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”*

*Fernando Teixeira de Andrade*

**Título:** Efeito da flunixinina meglumina, somatotropina recombinante bovina e sincronização de receptoras sobre a taxa de prenhez de embriões bovinos produzidos *in vitro*

**Autor:** Humberto Fernandes Veloso Neto

**Orientador:** Paulo Fernandes de Lima

## **Resumo**

A variabilidade do sucesso das transferências de embriões produzidos *in vitro* ainda é um dos entraves para sua expansão, onde alguns dos problemas são relacionados à mortalidade embrionária precoce. O objetivo com estes trabalhos foi avaliar a aplicação da flunixinina meglumina e da somatotropina recombinante bovina e observar o efeito de algumas variáveis como grau de desenvolvimento do embrião, sincronia do embrião com a receptora e classificação do corpo lúteo da receptora no momento da transferência sobre a taxa de prenhez. No experimento I foram utilizadas 55 novilhas receptoras de embrião agrupadas aleatoriamente: G1 grupo controle (n=15animais); G2 grupo que recebeu 500mg de somatotropina recombinante bovina/animal/por via subcutâneo (n=20 animais) e G3 grupo 500mg de flunixinina meglumina/animal/via intramuscular (n=20 animais). As taxas de prenhez para os grupos foram G1 53,33% (8/15), G2 60% (12/20), G3 55% (11/20) não havendo diferença significativa entre os grupos ( $P>0,05$ ). No experimento II foram utilizadas 134 novilhas como receptoras de embriões produzidos *in vitro*. A taxa de prenhez foi avaliada segundo grau de desenvolvimento da estrutura transferida, sincronia do embrião com a receptora e a classificação corpo lúteo. Embriões desenvolvidos (Blastocisto, Blastocisto expandido) apresentaram melhores índices de prenhez que embriões jovens (Mórula, Blastocisto inicial), 57,14% e 25% respectivamente ( $P<0,05$ ). Sincronia do embrião com a receptora que apresentou melhores taxas de prenhez foram: sincronia 0 (88,88%) e sincronia - 1 (68,42 %) em relação a sincronia + 1 (41,5 %) para  $P<0,05$  e classificação do corpo lúteo não houve diferença com CL1 grande 46,83%, CL2 médio 55,88%, CL3 pequeno 42,85% ( $P>0,05$ ). Nas condições deste experimento a aplicação da flunixinina meglumina e da somatotropina recombinantes bovina não foi eficiente para aumentar a taxa de prenhez, porém deve-se atentar que a taxa de prenhez foi dependente do grau de desenvolvimento do embrião e sincronia da receptora com o embrião.

**Palavras-chave:** FIV, novilha, bST, anti-inflamatório não esteroide

**Title:** Effect of flunixin meglumine, recombinant bovine somatotropin and synchronization of recipients on pregnancy rates of bovine embryos produced *in vitro*

**Author:** Humberto Fernandes Veloso Neto

**Advisor:** Paulo Fernandes de Lima

### **Abstract**

The variability of successful transfers of embryos produced *in vitro* is still one of the obstacle to its expansion, where some of the problems are related to early embryonic mortality. The aim of this work was to evaluate the application of flunixin meglumine and recombinant bovine somatotropin and observe the effect of variables such as embryonic development, embryo synchrony with the recipient, corpus luteum size at the time of transfer and pregnancy rate. In the first experiment 55 recipient heifers were randomly in the three different groups: G1 control group (n=15 animals); G2 group receiving 500mg of recombinant bovine somatotropin (bST)/animal/subcutaneous (n=20 animals) and G3 group receiving 500mg flunixin meglumine/animal/intramuscular (n=20 animals). Pregnancy rates for G1 53,33% (8/15), G2 60% (12/20), G3 55% (11/20) with no statistically significant difference between groups ( $P > 0,05$ ). In experiment II 134 heifers were used as recipients of embryos produced *in vitro*. The pregnancy rate was evaluated according to the degree of development of the structure transferred embryo synchrony with the receiver, and corpus luteum size. Embryos (blastocyst, expanded blastocyst, ecloded blastocyst) showed better pregnancy rates than less development younger embryos (morula, early blastocyst), 57,14% and 25% respectively ( $P < 0,05$ ). Synchrony with the recipient embryo -1 (68,42%), 0 (88,88%), +1 (41,5%) for  $P < 0,05$  and size of the corpus luteum large 46,83% CL1, CL2 average 55,88%, 42,85% CL3 small ( $P > 0,05$ ). In conclusion, under experiment conditions described, the application of flunixin meglumine, recombinant bovine somatotropin and was not efficient to increase the pregnancy rate, but it is note that the pregnancy rate varied in the degree of development of the embryo and the embryo synchrony with the recipient.

**Keywords:** IVF, heifer, bST, nonsteroidal anti-inflammatory

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo I

**FIGURA 1:** Taxas de prenhez de receptoras de embriões produzidos *in vitro* nos três grupos experimentais.....**pág.31**

### Artigo II

**FIGURA 1:** Percentagem de prenhez em relação a sincronia do embrião, onde Sincronia -1. Receptora deu cio um dia depois da fertilização *in vitro*, ou do cio da doadora, no caso de embriões produzidos *in vivo*. Sincronia 0 a receptora deu cio no dia da FIV, Sincronia +1 a receptora deu cio um dia antes da FIV.....**pág.46**

**FIGURA 2:** Representação esquemática do tempo da ocorrência do cio para o início do período crítico (início da produção de  $pgf2\alpha$  para luteólise), em cada grupo da sincronia de receptoras.....**pág.47**



## **LISTA DE TABELAS**

### **Artigo II**

**TABELA 1:** Percentagem da taxa de prenhez com relação ao grau de desenvolvimento embrionário, sincronia da receptora com embrião e qualidade do corpo lúteo sobre a taxa de prenhez em receptoras mestiças de embriões fertilizados *in vitro*.....**pág. 44**

## LISTA DE ABREVIATURAS

BE – Benzoato de estradiol

Bl – Blastocisto

Ble – Blastocisto eclodido

Bli – Blastocisto inicial

Blx – Blastocisto expandido

bST – Somatotropina recombinante bovina (Bovine Somatotropin)

CIV – Cultivo embrionário *in vitro*

CL – Corpo lúteo

COX – Ciclooxigenase

ECG – Gonadotrofina coriônica equina

FIV – Fertilização *in vitro*

FM – Flunixin Meglumine

GH – Hormônio do Crescimento ( Growth Hormone)

IA – Inseminação artificial

IATF – Inseminação artificial em tempo fixo

IFN- $\tau$  – Interferon-tau

IGF-I – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I

Kg – Kilograma

MIV – Maturação desses oócitos

mL – Mililitro

Mo – Mórula

MOET – Múltipla ovulação com transferência de embriões

mRNA – RNA mensageiro

OPU – Aspiração folicular (*ovum pick-up*)

P4 – Progesterona

PGF2 $\alpha$  – Prostaglandina F2 $\alpha$

PG – Prostaglandina

PIV – Produção in vitro

SOV – Superovulação

TE – Transferência de embrião

TETF – Transferência de embrião em tempo fixo

UI – Unidades Internacionais

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1. Objetivo Geral .....	15
2.2. Objetivo Específico .....	15
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
3.1. Mecanismo de luteólise e Prostaglandina F2 $\alpha$ (PGF2 $\alpha$ ) .....	16
3.2. Reconhecimento materno da gestação .....	17
3.3. Antiinflamatório não-esteróide .....	18
3.4. Somatotropina recombinante bovina (bST) .....	19
<b>4. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>21</b>
<b>5. ARTIGO I: Efeito do flunixin meglumine e da somatotropina recombinante bovina sobre a taxa de prenhez de receptoras bovinas de embriões produzidos <i>in vitro</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>6. ARTIGO II: Parâmetros que afetam a taxa de prenhez em receptoras bovinas de embriões produzidos <i>in vitro</i> .....</b>	<b>39</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>51</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da população humana e da demanda de alimentos no mundo tem servido de estímulo para os pecuaristas aumentar sua produtividade cada vez mais ao longo dos tempos, com o intuito de promover o ganho genético dos animais, os produtores têm introduzido em seus plantéis, técnicas reprodutivas para auxiliar no melhoramento genético como a inseminação artificial (IA), múltipla ovulação com transferência de embriões (MOET) e produção *in vitro* (PIV) de embriões (PARRA et al., 2008). Inicialmente a IA teve importante papel na disseminação do material genético do macho e, posteriormente, técnicas como o controle do ciclo estral, a superovulação (SOV) e a transferência de embriões (TE) proporcionaram um aumento na possibilidade de multiplicação do material genético oriundo da fêmea, a difusão dessas técnicas contribuíram para melhorar a qualidade e quantidade do produto final, seja carne ou leite (WATANABE et al., 2008).

A PIV de embriões bovinos iniciou a partir da recuperação de oócitos provenientes de fêmeas de abatedouros, permitindo o desenvolvimento de técnicas especializadas na maturação desses oócitos (MIV), fecundação *in vitro* (FIV), e cultivo embrionário *in vitro* (CIV). Com o incremento da ultrassonografia no monitoramento da atividade ovariana, e com o aperfeiçoamento da técnica de aspiração folicular (*ovum pick up*-OPU) transvaginal guiada por ultrassom de vacas vivas, foi possível obter um maior aproveitamento do potencial genético das fêmeas consideradas superiores, tornando mais eficaz a produção de embriões de alto valor genético (NAGAI, 2001; WATANABE et al., 2008). A utilização de sêmen sexado é outra ferramenta de melhoramento genético amplificada com o uso da FIV, onde o sêmen com espermatozoides classificados sexualmente podem ser usados para fertilizar mais oócitos *in vitro* do que fertilizaria no caso da IA (HANSEN, 2006).

A vantagem da aspiração folicular guiada por ultrassom na PIV está no fato de que não é necessário o uso de hormônios para a recuperação dos oócitos (BUENO e BELTRAN, 2008). Além de que, oócitos imaturos podem ser colhidos *in vivo* repetidas vezes de um mesmo animal por vários meses tendo grande potencial de aplicação a associação de OPU e FIV, e quando comparada com a produção *in vivo* de embriões, mediante indução de múltiplas ovulações e TE, a FIV por aspiração folicular de vacas vivas é capaz de produzir três vezes mais embriões (WATANABE et al., 2008).

O aprimoramento das condições de cultivo *in vitro* bem como das técnicas de recuperação de oócitos *in vivo* tornou viável a aplicação da PIV em escala comercial, sendo

importante seu desenvolvimento dentro do atual contexto de incremento da produtividade na pecuária e pesquisa de novas biotecnologias (SANGILD et al., 2000). Apesar destas vantagens, estudos relacionados à maturação oocitária, cultivo embrionário, criopreservação e aumento nas taxas de prenhez nas receptoras são ainda necessários visando à maximização desta técnica e a produção de embriões de boa qualidade. Isto é de suma importância para a diminuição dos custos da PIV, tornando-a mais acessível aos produtores (BUENO e BELTRAN, 2008).

O desenvolvimento da pecuária nacional está associado às biotécnicas utilizadas e o Brasil é detentor de um bom nível técnico-científico das biotécnicas aplicadas à reprodução animal e tem destacado-se como um dos maiores produtores de embriões *in vitro*, não só pelo domínio da técnica, mas pela qualidade do nosso rebanho, principalmente no tocante a gado de corte (VIEIRA, 2012).

No entanto, a variabilidade do sucesso das transferências de embriões produzidos *in vitro* ainda é um dos entraves para sua expansão, onde alguns dos problemas são relacionados principalmente com as receptoras (ANDRADE et al., 2012). A mortalidade embrionária precoce é uma causa reconhecida de falha reprodutiva em bovinos provocando grandes impactos econômicas tanto em gado de corte como de leite (ERDEM e GUZELOGLU, 2010), podendo resultar de um defeito intrínseco do embrião, de um ambiente materno inadequado, da assincronia entre o embrião e o útero ou da falha da mãe em responder apropriadamente aos sinais do embrião (HANSEN, 2006).

O período de pré-implantação, após a transferência do embrião, é considerado crítico para o desenvolvimento dos embriões em ruminantes. Uma série de eventos coordena o crescimento e a sobrevivência dos embriões, envolvendo a atuação de citocinas, esteróides, metabólitos e fatores de crescimento, responsáveis por garantir o sucesso da gestação e o subsequente desenvolvimento fetal (LIMA e SOUZA, 2009). Com o advento das novas biotecnologias essas falhas se tornaram mais evidentes, principalmente devido a defeitos intrínsecos do embrião, sendo que quanto maior o grau de artifícios da técnica utilizada, maiores são as perdas embrionárias (SARTORI e DODE, 2008).

Existem vários relatos na literatura de taxa de prenhez de embriões bovinos produzidos em diferentes sistemas de cultivo, com médias variando de 30 a 51% (HASLER, 2000; FARIN, CROSIER e FARIN, 2001; LANE et al., 2003; DIAS et al., 2006; SCHMIDT, 2007, ANDRADE et al., 2012), sendo mais baixas do que as taxas obtidas com embriões produzidos *in vivo*. FARIN, CROSIER e FARIN, (2001) relataram que no dia 17 da gestação

19% dos embriões produzidos *in vitro* estavam degenerados, sugerindo que os embriões PIV podem ser deficientes em iniciar os mecanismos essenciais para o reconhecimento materno da prenhez.

O bloqueio da luteólise, e consequentemente a prenhez, só se estabelecerá se o concepto for competente para enviar sinais antiluteolíticos apropriados e o endométrio tiver a capacidade de responder a tais sinais, bloqueando a produção de prostaglandinas F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ). Assim, para bloquear efetivamente o processo luteolítico, o concepto deve ter-se alongado suficientemente para ocupar a maior parte do lúmen do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo (CL). Sendo assim, embriões subdesenvolvidos e, portanto, não alongados suficientemente serão menos capazes de bloquear a luteólise e consequentemente poderão ser mais facilmente abortados (BINELLI et al., 2004).

O desenvolvimento de estratégias antiluteolíticas, visando aumentar a sobrevivência dos embriões, foram sugeridas por Binelli et al. (2001), com objetivos específicos das estratégias propostas sendo: (1) aumentar o tamanho do folículo pré-ovulatório para gerar um CL maior, (2) aumentar a taxa de crescimento do CL, (3) aumentar as concentrações plasmáticas de progesterona (P4) durante a fase luteínica, (4) diminuir o efeito de um folículo dominante durante o período crítico, (5) aumentar o estímulo antiluteolítico do concepto e (6) diminuir a capacidade luteolítica do útero materno, onde estratégias similares foram propostas também por Santos et al. (2004) para aumentar a sobrevivência embrionária em bovinos.

Em concordância com o exposto acima, pode-se utilizar determinadas estratégias antiluteolíticas em receptoras bovinas de embriões produzidos *in vitro*, com o objetivo de aumentar as taxas de prenhez, visando assim, uma diminuição do custo da produção desses embriões, no qual incrementar o estímulo antiluteolítico do concepto e diminuir a capacidade luteolítica do útero podem ser propostas viáveis a serem inseridas em programas de inovulações desses embriões nas receptoras.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Aumentar as taxas de prenhez do utilizando estratégias antiluteolíticas em um protocolo de transferência de embrião em tempo fixo (TETF) utilizando embriões produzidos *in vitro*, à frescos.

### **2.2. Específicos**

1. Avaliar o efeito da administração do flunixin meglumina no dia da transferência de embriões, em receptoras de embriões bovinos sobre taxa de prenhez;
2. Avaliar o efeito do bST aplicado no momento da transferência em receptoras de embrião bovino sobre a taxa de prenhez;
3. Avaliar a taxa de prenhez de acordo com desenvolvimento do embrião transferido, sincronia do embrião com a receptora e com a avaliação do corpo lúteo.



### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Mecanismo de luteólise e Prostaglandina F2 $\alpha$ (PGF2 $\alpha$ )

O ciclo estral dos bovinos tem uma duração média de 21 dias, dividido em quatro fases; proestro, estro, metaestro e diestro, onde as duas primeiras são caracterizadas elevação dos níveis de estrógenos na corrente sanguínea. O metaestro é a fase onde ocorre a ovulação e o início da formação do corpo lúteo, e o diestro é caracterizado pela presença do corpo lúteo e altos níveis de progesterona na corrente sanguínea, para que haja um novo o ciclo estral, o endométrio possui receptores para a ocitocina e estrógenos onde tais hormônios estimulam a produção de PGF2 $\alpha$ , pelas células endometriais, causando assim a lise do corpo lúteo e iniciando um novo ciclo (REICHENBACH et al., 2008).

A síntese de PGF2 $\alpha$  começa com a liberação do ácido araquidônico da membrana de fosfolípidios pela ação da enzima fosfolipase A2 citosólica (GIJON e LESLIE, 1999), o ácido araquidônico livre é então convertido em prostaglandina G2 e prostaglandina H2, pela ação da ciclooxigenase COX-2 e finalmente a prostaglandina-sintetase medeia a formação de PGF2 $\alpha$ , a partir da prostaglandina H2. O endométrio bovino contém grandes quantidades de ácido araquidônico que podem ser facilmente convertidos para diferentes produtos como a PGF2 $\alpha$  (SALAMONSEN e FINDLAY, 1990).

Em vacas, o procedimento de transferência de embrião, inclui a transferência de um embrião, para o corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo (CL). Entretanto essa manipulação do trato reprodutivo da fêmea tem sido responsabilizada por aumentar a liberação de PGF2 $\alpha$ , no lúmen uterino (WANN e RANDEL, 1990; VELEZ, RANDEL e NEUENDORFF, 1991; SCENNA et al., 2005). Apesar da liberação de PGF2 $\alpha$ , após a manipulação do útero, não ser suficiente para resultar em luteólise, a sobrevivência embrionária pode ser comprometida pela presença de pequenas concentrações de PGF2 $\alpha$  no lúmen uterino, criando um “ambiente hostil” para desenvolvimento embrionário (SCENNA et al., 2005).

Vários estudos *in vivo*, têm apresentado efeitos negativos da PGF2 $\alpha$ , sobre a sobrevivência embrionária em vacas de corte. (SCHRICK, INSKEEP e BUTCHER, 1993; BUFORD et al., 1996). Além disso, a adição de PGF2 $\alpha$  ao meio de cultura tem sido apresentado por inibir o desenvolvimento *in vitro* de embriões de bovinos (SCENNA et al.,

2004). Scenna et al., (2005) constataram que embriões de grau II são mais susceptíveis aos efeitos deletérios da PGF2 $\alpha$  do que os de grau I.

### 3.2. Reconhecimento materno da gestação

O reconhecimento materno da gestação pode ser definido como o período em que o conceito sinaliza sua presença para a mãe. Em ruminantes, este período requer o alongamento do embrião, que coincide com a máxima produção de interferon-tau (IFN- $\tau$ ) (ANTONIAZZI et al., 2011), que é uma proteína sintetizada pelas células trofoblásticas embrionárias. No bovino, o pico da secreção ocorre entre o 15<sup>o</sup> e 16<sup>o</sup> dia do ciclo estral, com início da produção no dia 12, estendendo-se até o 26<sup>o</sup> dia (FARIN et al., 1990), o qual apresenta forte efeito antiluteolítico, atuando por meio da inibição ou alteração dos padrões de síntese e secreção de prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>  pelo endométrio (EALY et al., 2004).

O mecanismo de atuação do IFN- $\tau$  é através do bloqueio da expressão dos receptores de estrógeno e ocitocina de origem luteal e hipofisária, agindo de maneira parácrina no epitélio luminal do endométrio evitando assim, a liberação de pulsos luteolíticos de PGF2 $\alpha$  (DEMMERS, DERECKA e FLINT, 2001; ANTONIAZZI et al., 2011). Araújo et al., (2005) relataram em um estudo *in vitro* que a produção de IFN- $\tau$  é menor nos embriões que foram congelados em relação aos embriões frescos, sugerindo que a criopreservação prejudicou a produção de IFN- $\tau$  pelo trofoblasto. Esta diferença foi mais acentuada no 14<sup>o</sup> dia de desenvolvimento (168 horas de cultivo).

Kerbler et al., (1997) afirmaram que no embrião o início da expressão do gene do IFN- $\tau$  parece ser programado de um modo geneticamente independente do ambiente uterino uma vez que ele é expresso em sistemas *in vivo* e *in vitro*. No entanto, a produção de IFN- $\tau$  é influenciada pelo ambiente uterino, pois sua produção *in vitro* aumenta na presença de tecido uterino. A expressão de IFN- $\tau$  termina com a implantação, pois o contato do trofoblasto com o endométrio cessa sua produção (DEMMERS, DERECKA e FLINT, 2001).

No complexo mecanismo de reconhecimento materno da gestação em ruminantes, foi identificado um novo componente: a função endócrina do IFN- $\tau$ . Essa ação do IFN- $\tau$  soma-se a sua conhecida função parácrina, adicionando assim, outra importante variável ao mecanismo. Os dados sugerem que a função endócrina do IFN- $\tau$  pode estar diretamente ligada com a ativação da expressão de genes no corpo lúteo e estes modulam parcial ou totalmente a

resistência luteal à ação luteolítica da PGF<sub>2</sub>, que por sua vez, é vital no reconhecimento materno da gestação (ANTONIAZZI et al., 2011).

### **3.3. Anti-inflamatório não esteroide**

As drogas anti-inflamatórias não esteroides são extensamente utilizadas nos animais, com propósito de alívio sintomático no tratamento de condições dolorosas e inflamatórias agudas ou crônicas, onde o mecanismo de ação consiste basicamente na inibição das cicloxigenases, que acarretará na diminuição de endoperóxidos cíclicos, tais como prostaciclina, tromboxano e prostaglandinas. As cicloxigenases inibidas são as cicloxigenases-1 (COX-1) e cicloxigenases-2 (COX-2); a primeira é uma enzima constitutiva encontrada na maioria dos tecidos relacionadas com efeitos fisiológicos e a segunda produzidas pelas células mediadoras da inflamação (ANDRADE e JERICÓ, 2002).

Estratégias que objetivem a inibição específica de enzimas que participem da síntese de PGF durante o período crítico devem aumentar taxas de prenhez em fêmeas bovinas (BINELLI et al., 2004). Elli et al., (2001) administraram lisinato de ibuprofeno (um anti-inflamatório não esteroide que inibe a atividade da enzima COX-2, uma hora antes da transferência de embriões. Taxas de prenhez foram maiores para animais tratados do que para animais controle (82 vs. 56%, respectivamente).

Novilhas da raça Holandesa foram tratadas com flunixin meglumina nos dias 15 e 16 pós-inseminação artificial (período crítico do reconhecimento materno da gestação) e observou-se maiores taxas de prenhez nos dias 29 (76,9 vs. 50%;  $P < 0,04$ ) e 65 de gestação (69,2 vs. 46,2%;  $P < 0,09$ ) para os animais que receberam o anti-inflamatório em relação aos animais controle (GUZELOGLU et al., 2005). Negreiros et al., (2007) administraram flunixin meglumina no dia 14 após IA em novilhas Girolando, observando maiores taxas de prenhez do que nas receptoras que receberam somente o protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Com relação à transferência de embriões, Scenna et al. (2005) observaram que as taxas de prenhez foram maiores nas receptoras que receberam o flunixin meglumina (65%) no momento da inovulação, com relação ao grupo não tratado (60%;  $P < 0,02$ ) possivelmente o tratamento com flunixin meglumina inibiu temporariamente a liberação de PGF de forma a favorecer o estabelecimento dos mecanismos antiluteolíticos do conceito (produção de interferon-tau), o que resultou em menor mortalidade embrionária (BINELLI et al., 2004).

### 3.4. Somatotropina recombinante bovina (bST)

O hormônio do crescimento ou somatotropina é um hormônio proteico, sintetizado e secretado pela glândula hipófise anterior. Existem comercialmente produtos no mercado provenientes de moléculas sintéticas de somatotropina, produzidas pela técnica do DNA recombinante e sua administração em vacas de leite é uma biotecnologia amplamente utilizada devido a sua comprovada capacidade em promover aumentos significativos na produção de leite, e por consequência maior retorno econômico, sem efeitos adversos à saúde humana e animal (CAMPOS, 2008).

Geralmente as respostas de ganho na produção de leite, são de 10 a 15% embora possam ocorrer ganhos maiores quando há excelentes condições de manejo e cuidados com os animais (ETHERTON e BAUMAN, 1998), sendo tal eficiência decorrente da estabilidade, por maior tempo, da curva do pico de lactação e persistência da lactação nas vacas (ETHERTON e BAUMAN, 1998; RENNÓ et al., 2006).

O bST estimula a produção do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) e do hormônio do crescimento (GH) endógeno. O aumento na produção de leite ocorre em resposta a essa elevação nas concentrações de IGF-I no sangue. A maior quantidade de receptores para a somatotropina é encontrada no fígado, o qual é responsável pela grande parte do IGF-I produzido no organismo (LUCY, 2000).

Outra estratégia consiste em estimular o crescimento do concepto tornando-o mais eficiente em produzir o IFN- $\tau$  e conseqüentemente evitar a luteólise, uma vez que a capacidade de secreção de IFN- $\tau$  está relacionada diretamente ao tamanho do concepto (GEISSERT e MALAYER, 2000).

Alguns efeitos importantes mediados pelo IGF-I em células embrionárias são o aumento na proliferação celular (RECHLER e NISSLEY, 1990) e potente inibição da apoptose (PERUZZI et al., 1999), onde Jousan e Hansen (2004) mostraram que o IGF-I aumenta o número total de células e reduz o número de blastômeros que se tornam apoptóticos em embriões bovinos submetidos ao estresse térmico *in vitro*.

Moreira et al., (2002a) desenvolveram estudos *in-vitro* nos quais indicaram que os fatores de crescimento semelhantes à insulina tipo I (IGF-I) estimularam o desenvolvimento de embriões bovinos. *In vivo*, Moreira et al. (2002b) administraram somatotropina recombinante bovina (bST) à doadoras de embriões superovuladas e à receptoras de embriões, resultando no aumento da porcentagem de embriões transferíveis, o número de blastocistos

obtidos por lavagem, e as taxas de prenhez de receptoras tratadas com bST, logo o IGF-I aumenta o desenvolvimento até o estágio de blastocisto e o número de células em embriões bovinos tanto *in vitro* quanto em *in vivo*, assim estimulando o crescimento do conceito, tornando-o mais capacitado para produzir o IFN- $\tau$  para bloquear a luteólise e diminuir a morte embrionária precoce.

#### 4. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, G. A.; FERNANDES, M. A.; KNYCHALA, R. M.; PEREIRA JUNIOR, M. V.; OLIVEIRA, A. J.; NUNES, D. P.; BONATO, G. L.; SANTOS, R. M. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.36, n.1, p.66-69, 2012.
- ANDRADE, S. F.; JERICÓ, M. M.; Antinflamatórios. In: ANDRADE, S. F. **Manual Terapêutica Veterinária**; 2ª Ed. São Paulo SP: Ed. Roca, p.89-113, 2002.
- ANTONIAZZI, A. Q.; HENKES, L. E.; OLIVEIRA, J. F. C.; HANSEN, T. R. Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.1, p.176-185, jan, 2011.
- ARAUJO, M. C. C.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; BARRETO FILHO, J. B.; SERAPIÃO, R. V.; CAMARGO, L. S. A.; SILVA, M. V. G. B.; VALE FILHO, V. R. Secreção de interferon-tau em embriões bovinos produzidos *in vitro* criopreservados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.6, p.752-756, 2005.
- BINELLI, M.; MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M. A. C. M.; BARUSELLI, P. S. Atualizações sobre estratégias antiluteolíticas para o aumento da fertilidade em bovinos. In: **Anais... Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, 2004, Londrina. Anais... Londrina: SBRA, p.191-198, 2004.
- BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v.56, n.9, p.1451-1463, 2001.
- BUENO, A. P.; BELTRAN, M. P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano VI, n.11, 2008.
- BUFORD, W. I.; AHMAD, N.; SCHRICK, F. N.; BUTCHER, R. L.; LEWIS, P. E.; INSKEEP, E. K. Embryotoxicity of a regressing corpus luteum in beef cows supplemented with progestogen. **Biology of Reproduction**, v.54, n.3, p.531-537, 1996.
- CAMPOS B. G. **Somatotropina Recombinante: Uma ferramenta para aumento da eficiência produtiva**. Publicações REHAGRO; publicado em 07/01/2008. Disponível em <<http://www.rehagro.com.br/siterehagro/publicacao.do?cdnoticia=1595>>, Acesso em 01 de Agosto de 2011.
- DEMMERS, K. J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. **Reproduction**, v.121, n.1, p.41-49, 2001.

- DIAS, C. C.; ALVIN, M. T. T.; SALIBA, W. P.; VASCONCELOS, J. L. M. Fatores relacionados ao embrião e à receptora que influenciam o sucesso das transferências de embriões de coleta convencional ou de fertilização in vitro. **Acta Scientiae Veterinariae**, Resumo, v.34, n.1, p.412, 2006.
- EALY, A. D.; WAGNER, S. K.; SHEILS, A. E.; WHITLEY, N. C.; KIESLING, D. O.; JOHNSON, S. E.; BARBATO, G. F. Identification of Interferon- $\tau$  isoforms expressed by the peri-implantation goat (*Capra hircus*) conceptus. **Domestic Animal Endocrinology**, v.27, n.1, p.39-49, 2004.
- ETHERTON, T. D.; BAUMAN, D. E. Biology of Somatotropin in Growth and Lactation of Domestic Animals. **Physiological Review**, v.78, p.745-761, 1998.
- ERDEM, H.; GUZELOGLU, A. Effect of Meloxicam Treatment during Early Pregnancy in Holstein Heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, n.4, p.625-628, 2010.
- FARIN, P. W.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.151-170, 2001.
- FARIN, C. E.; IMAKAWA, K.; HANSEN, R.; MCDONNELL J. J.; MURPHY, C. N.; FARIN, P. W.; ROBERTS R. M. Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. **Biology of Reproduction**, v.43, n.2, p.210-218, 1990.
- GEISERT, R. D.; MALAYER, J. R. Implantation. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals**, 7<sup>th</sup>ed Philadelphia: Ed. Lea & Febiger, p.184-213, 2000.
- GIJÓN, M. A.; LESLIE, C. C. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v.65, n.3, p.330-336, 1999.
- GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H.; VALE, W. G. **Patologia e clinica da reprodução dos animais mamíferos domésticos**, São Paulo, Varela, p.170-175, 2005.
- GUZELOGLU, A.; ERDEM, H.; SARIBAY, M. K.; THATCHER, W. W.; TEKELI, T. Effect of the administration of flunixin meglumine on pregnancy rates in Holstein heifers. **Veterinary Records**, v.160, n.12, p.404-406, 2007.
- HANSEN, P. J. Realizing the promise of IVF in cattle: an overview. **Theriogenology**, v.65, n.1, p.119-125, 2006.
- HASLER, J. F. In vitro culture of bovine embryos in Ménézo's B2 medium with or without co-culture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. **Animal Reproduction Science**, v.2, n.60-61, p.81-91, 2000.

- JOUSAN, F. D.; HANSEN, P. J. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. **Biology of Reproduction**, v.71, n.5, p.1665-1670, 2004.
- KERBLER, T. L.; BUHR, M. M.; JORDAN, L. T.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. **Theriogenology**, v.47, n.3, p.703-714, 1997.
- LANE, M.; GARDNER, D. K.; HASLER, M. J.; HASLER, J. F. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. **Theriogenology**, v.60, n.3, p.407-419, 2003.
- LIMA, I. M. T.; SOUZA, A. L. Desenvolvimento e sobrevivência de embriões no período de pré-implantação: enfoque em ruminantes. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.194-202, 2009.
- LUCY, M. C. Regulation of follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.83, n.7, p.1635-1647, 2000.
- MOREIRA, F.; PAULA LOPES, F. F.; HANSEN, P. J.; BADINGA, L.; THATCHER, W. W. Effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.57, n.5, p.895-907, 2002a.
- MOREIRA, F.; BANDIGA, L.; BURNLEY, C.; THATCHER, W. W. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. **Theriogenology**, v.57, n.4, p.1371-1387, 2002b.
- PARRA, B. C.; PARRA, B. S.; ZANGIROLAMI FILHO, D.; BUENO, A. P. Aspecto sanitário na transferência de embriões de bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano VI, n.10, 2008.
- NAGAI, T. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. **Theriogenology**, v.55, p.1291-1301, 2001.
- NEGREIROS, G. O.; RESENDE FILHO, O.; BEZERRA, E. E. A.; MINEIRO, A. L. B. B.; SILVA, J. M.; VIEIRA, R. J. Influência do Flunixin Meglumine na taxa de prenhez de vacas leiteiras submetidas a protocolo de inseminação artificial em tempo fixo – nota prévia, Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba, PR. **Anais ...** Belo Horizonte, MG: CBRA, 2007.



- PARRA, B. C.; PARRA, B. S.; ZANGIROLAMI FILHO, D.; BUENO, A. P. Aspecto sanitário na transferência de embriões de bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano VI, n.10, 2008.
- PERUZZI, F. M.; PRISCO, M.; DEWS, M.; SALOMONI, P.; GRASSILLI, E.; ROMANO, G.; CALABRETTA, B.; BASERGA, R. Multiple signaling pathways of the insulin-like growth factor 1 receptor in protection from apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v.19, n.10, p.7203-7215, 1999.
- RECHLER, M. M.; NISSLEY, S. P. Insulin-like growth factors. **Handbook Experimental Pharmacology**. v.95, p.263-281, 1990.
- REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; ANDRADE, J. C. O.; TENÓRIO FILHO, F.; SANTOS, M. H. B.; OLIVEIRA FILHO, B. D.; MEIRINHOS, M. L. G.; SANTOS FILHO; A. S. Transferência e Criopreservação de Embriões Bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDI, J. R.; FREITAS, V. J. F.. **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal**; 2ªed,São Paulo–SP: Ed: Roca, 2008.
- RENNÓ, F. P.; LUCCI, C. S.; SILVA, A. G.; RENNÓ, F. P.; RENNÓ, L. N.; RENNÓ NETO B. P.; CECON, P. R.; BARBOSA, P. F. Efeito da somatotropina bovina recombinante (rBST) sobre o desempenho produtivo e reprodutivo de vacas da raça Holandesa; **Arquivo Brasileiro. Medicina Veterinária Zootecnia**, v.58, n.2, p.158-166, 2006.
- SALAMONSEN, L. A.; FINDLAY, J. K. Regulation of endometrial prostaglandins during the menstrual cycle and in early pregnancy. **Reproduction, Fertility and Development**, v.2, n.5, p.443-457, 1990.
- SANGILD, P. T.; SCHMIDT, M.; JACOBSEN, H.; FOWDEN, A. L.; FORHEAD, A.; AVERY, B.; GREVE, T. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro produced bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.62, n.6, p.1495-1504, 2000.
- SANTOS, J. E.; THATCHER, W. W.; CHEBEL, R. C.; CERRI, R. L.; GALVÃO, K. N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v.82/83, p.513-535, 2004.
- SARTORI, R.; DODE, M. A. N. Mortalidade embrionária na IA, TE, FIV e clonagem. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3, 2008, **Anais...** Londrina-PR. p.175-194, 2008.
- SCHMIDT M. Perinatal death associated with ET, IVP and cloning in cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.49 (Suppl 1), p.13, 2007.

- SCENNA, F. N.; HOCKETT, M. E.; TOWNS, T. M.; SAXTON, A. M.; ROHRBACH, N. R.; WEHRMAN, M. E.; SCHRICK, F. N. Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. **Animal Science. Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v.78, n.1-4, p.38-45, 2005.
- SCENNA, F. N.; EDWARDS, J. L.; ROHRBACH, N. R.; HOCKETT, M. E.; SAXTON, A. M.; SCHRICK, F. N. Detrimental effects of prostaglandin F2 alpha on preimplantation bovine embryos. **Prostaglandins Other Lipid Mediators**, v.73, n.3-4, p.215-226, 2004.
- SCHRICK, F. N.; INSKEEP, E. K.; BUTCHER, R. L. Pregnancy rates for embryos transferred from early postpartum beef cows into recipients with normal estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.49, n.3, p.617-621, 1993.
- VELEZ, J. S.; RANDEL, R. D.; NEUENDORFF, D. A. Effect of uterine manipulation on postpartum fertility and plasma 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 in Brahman cows and first-calf heifers. **Theriogenology**, v.36 p.987-997, 1991.
- VIEIRA, R. J. Biotécnicas aplicadas à reprodução bovina: generalidades. **Ciência Animal**, vol.22, n.1, p.55-65, 2012.
- WATANABE, Y. F.; ACCORSI, M. R.; WATANABE, M. R.; DAYAN, A.; MEIRELLES, F. V. Aspecto comercial de embriões bovinos produzidos in vitro. In: Gonçalves, P. B. D.; Figueredo, J. R.; Freitas, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2<sup>a</sup> Ed. Roca, São Paulo, 2008.
- WANN, R. A.; RANDEL, R. D. Effect of uterine manipulation 35 days after parturition on plasma concentrations of 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin F2 in multiparous and primiparous Brahman cows. **Journal Animal Science**, v.68, n.5, p.1389-1394, 1990.

# ARTIGO I

---

**EFEITO DO FLUNIXIM MEGLUMINE E DA SOMATOTROPINA  
RECOMBINANTE BOVINA SOBRE A TAXA DE PREENHEZ DE  
RECEPTORAS BOVINAS DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*.**

**Veloso Neto, H. F.; Pereira, L. C.; Andrade, J. C. O.; Souza, B. P. A.; Oliveira, M. A. L.;  
Lima P. F.**

**Efeito do flunixin meglumine e da somatotropina recombinante bovina sobre a taxa de prenhez de receptoras bovinas de embriões produzidos *in vitro***

Effect of flunixin meglumine and recombinant bovine somatotropin on pregnancy rates of recipients of bovine embryos produced in vitro

**VELOSO NETO, Humberto Fernandes<sup>1</sup>; PEREIRA, Lucas Carvalho<sup>1</sup>; ANDRADE, Joaquim Correia de Oliveira<sup>2</sup>; SOUZA, Bartira Pastor de Andrade<sup>2</sup>; OLIVEIRA, Marcos Antônio Lemos<sup>3</sup>; LIMA, Paulo Fernandes<sup>3</sup>**

**RESUMO**

A aplicação em escala comercial da fertilização *in vitro* tornou-se viável após o advento da aspiração folicular *in vivo* e pelo aprimoramento das condições de cultivo *in vitro*. A mortalidade embrionária precoce é uma causa reconhecida de falha reprodutiva em bovinos não assegurando bons índices de prenhez o que pode gerar perdas econômicas e aumento nos custos de produção da FIV. Foram utilizadas 55 novilhas receptoras de embrião agrupadas aleatoriamente: G1 o grupo controle (n=15 animais); G2 grupo que recebeu 500 mg de somatotropina recombinante bovina/animal por via subcutânea (n=20 animais) e G3 grupo que recebeu 500mg de flunixin meglumine/animal por via intramuscular (n=20 animais). As taxas de prenhez para G1 53,33% (8/15), G2 60% (12/20), G3 55% (11/20) não diferiram (P>0,05) entre os grupos. Conclui-se, portanto, que a aplicação da somatotropina recombinante bovina e flunixin meglumine no momento da transferência de embriões, em novilhas como receptoras de embriões produzidos *in vitro* não é recomendada para o incremento na taxa de gestação, necessitando mais pesquisas para alavancar os índices de sucesso e contribuir ainda mais para disseminação da biotecnologia.

**Termos de indexação:** anti-inflamatório não esteroide; hormônio do crescimento; FIV

**ABSTRACT**

The commercial scale application of *in vitro* fertilization became viable after the advent of *ovum* pick-up (OPU) *in vivo* and the improvement of culture conditions *in vitro*. The early

<sup>1</sup> Méd. Vet., Pós graduação em Ciência Veterinária-UFRPE.

<sup>2</sup> Méd. Vet., Msc. Nordeste InVitro.

<sup>3</sup> Méd. Vet., Dr. Prof. Associado, UFRPE, Depto. de Medicina Veterinária. Av. Dom Manuel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE.  
Ciência Veterinária nos Trópicos

embryonic mortality is a recognized cause of reproductive failure in cattle not ensuring good pregnancy rates which can cause economic losses and increase in production costs of IVF. It used 55 embryo recipient heifers grouped randomly: G1 control group (15 animals); G2 group receiving 500 mg of recombinant bovine somatotropin (bST)/animal/subcutaneous (20 animals) and G3 group receiving 500 mg of flunixin meglumine/animal/intramuscular (20 animals). Pregnancy rates for G1 53.33% (8/15), G2 60% (12/20), G3 55% (11/20) with no statistically significant difference between groups ( $P > 0.05$ ). In conclusion, therefore, that the application of recombinant bovine somatotropin and flunixin meglumine at the time of transfer into recipients of bovine embryos produced *in vitro* heifers is not recommended to increase the pregnancy rate, requiring more research to leverage the success rates and further contribute to the spread biotechnology.

**Index terms:** nonsteroid anti-inflammatory; growth hormone; IVF

## INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotécnica de reprodução assistida e uma ferramenta para pesquisa de eventos relacionados à maturação e fecundação de oócitos, capacitação espermática e desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação. Além disso, a PIV é um instrumento de suporte para outras biotécnicas como clonagem, transgênese e transferência nuclear. Sua aplicação em escala comercial se tornou viável após o advento da aspiração folicular *in vivo* e pelo aprimoramento das condições de cultivo *in vitro* (GONÇALVES et al., 2008).

Apesar da PIV de embriões já ser uma realidade comercial no Brasil, os índices de blastocistos obtidos ainda estão aquém do desejado, variando entre 20-50% (média de 35%). Além da baixa eficiência da técnica, os embriões que conseguem se desenvolver *in vitro* apresentam qualidade inferior àqueles produzidos *in vivo*. Diversos parâmetros são utilizados para avaliar a qualidade dos embriões PIV como morfologia, criotolerância, transcrição (mRNA), eclosão *in vitro* e prenhez após a transferência. Entretanto, nenhuma dessas técnicas permite uma seleção eficiente que assegure bons índices de prenhez. O aumento da eficiência da PIV está condicionado ao desenvolvimento de trabalhos que visem aperfeiçoar e simplificar as condições de cultivo durante as várias etapas do processo, principalmente no que se refere à maturação citoplasmática e molecular de oócitos obtida *in vitro* (GONÇALVES et al., 2008).

A mortalidade embrionária precoce é uma causa reconhecida de falha reprodutiva em bovinos provocando grandes perdas econômicas. Essa pode resultar de um defeito intrínseco do embrião, de um ambiente materno inadequado, da assincronia entre o embrião e o útero ou da falha da mãe em responder apropriadamente aos sinais do embrião (HANSEN, 2006). Existem vários relatos na literatura de taxa de prenhez de embriões bovinos produzidos *in vitro*, com médias variando de 30 a 51% (HASLER, 2000; FARIN et al., 2001; LANE et al., 2003; DIAS et al., 2006; SCHMIDT, 2007, ANDRADE et al., 2012), e que são mais baixas quando comparadas as taxas obtidas com embriões produzidos *in vivo*.

O desenvolvimento de estratégias antiluteolíticas, visando aumentar a sobrevivência dos embriões, foram sugeridas por Binelli et al. (2001), com objetivos específicos das estratégias propostas sendo: (1) aumentar o tamanho do folículo pré-ovulatório para gerar um CL maior, (2) aumentar a taxa de crescimento do CL, (3) aumentar as concentrações plasmáticas de progesterona durante a fase luteínica, (4) diminuir o efeito de um folículo dominante durante o período crítico, (5) aumentar o estímulo antiluteolítico do concepto e (6) diminuir a capacidade luteolítica do útero materno, onde estratégias similares foram propostas também por Santos et al. (2004), para aumentar a sobrevivência embrionária em bovinos.

Objetiva-se com este estudo aumentar as taxas de prenhez em receptoras bovinas de embriões reproduzidos *in vitro* diminuindo a capacidade luteolítica do útero materno com aplicação do flunixin meglumine (antinflamatório não esteroide), e em outro grupo, aumentando o estímulo antiluteolítico do concepto através da elevação dos níveis do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I) circulantes através da aplicação da somatotropina recombinante bovina, utilizada hoje comercialmente para aumento na produção de leite nos bovinos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O referido experimento obteve a apreciação do comitê de ética e experimentação animal (CEUA-UFRPE) sob licença nº 009/2012. Foram utilizadas 55 receptoras, novilhas com peso médio de 350 kg, mestiças (Red Angus x Zebu) provenientes da Fazenda Engenho Ocidental – Zona da Mata Sul do Estado de Pernambuco. Realizou-se uma avaliação visual do estado geral, conformação, peso, escore corporal e presença de infestação por ectoparasitas, além da avaliação ginecológica segundo Grunert et al., (2005). Todas as novilhas receberam vacinas contra brucelose quando bezerras. Os animais receberam manejo nutricional

constituído do fornecimento de pasto plantado (*Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha* cv. GM5), sal mineralizado com suplemento proteico e água *ad libitum*.

Doadoras zebuínas de outras propriedades foram selecionadas para coleta de oócitos. A aspiração folicular foi realizada pela com a técnica de aspiração transvaginal guiada por ultrassom (OPU-*Ovum Pick-Up*). Os ovócitos aspirados eram classificados quanto à qualidade em graus de 1 a 4 (PALMA, 2001) e transportados ao laboratório (InVitro®) em meio Tissue Culture Medium (TCM 199) tamponado com HEPES, com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, à temperatura de 38,5°C em incubadoras portáteis. Ao chegarem ao laboratório, foram maturados, fertilizados e cultivados sob ambiente controlado. Após a produção, os embriões foram classificados, sendo utilizados apenas os de grau 1 – excelente/bom, à frescos (WRIGHT, 1998).

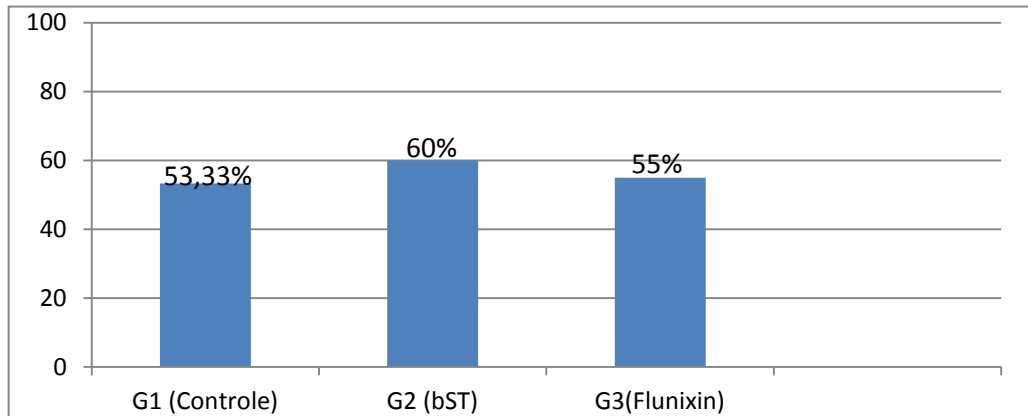
As receptoras aprovadas na avaliação ginecológica foram selecionadas para o protocolo de transferência de embrião em tempo fixo (TETF), da seguinte forma: no dia 0, insere-se o dispositivo intravaginal de progestágeno, com administração intramuscular de 2 mg de Benzoato de estradiol, no dia 7 é administrado 200 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (ECG) e 0,150 mg de D-Cloprostenol, no D8 procede-se a retirada do dispositivo, e 0,5 mg de benzoato de estradiol intramuscular; observação de cio no dia 9, dia 10 e dia 11 e no dia 17 procede-se a inovulação em tempo fixo.

Imediatamente antes da inovulação do embrião, as receptoras foram avaliadas por palpação retal para confirmar sua resposta adequada ao protocolo hormonal com a presença do corpo lúteo (CL), em seguida foram agrupadas aleatoriamente em três grupos sendo: G1 o grupo controle (15 animais); G2 grupo que recebeu 500 mg de somatotropina recombinante bovina (Boostin®-Schering-Plough Animal Health; bST) por animal por via subcutânea em 20 animais e G3 grupo que recebeu 500mg de flunixin meglumine (Banamine®-Schering-Plough Animal Health) por animal, por via intramuscular, em 20 animais. Os embriões produzidos *in vitro* foram transferidos no terço final do corno uterino ipsilateral ao ovário com CL presente, e em seguida realizada aplicação do tratamento a ser testado. A transferência dos embriões foi realizada por técnicos especializados, pelo método transcervical (não cirúrgico). O diagnóstico de prenhez foi realizado entre 30 e 35 dias após a inovulação, por ultrassom com aparelho Mindray® DP2200Vet.

A variável taxa de prenhez, sendo um dado qualitativo dicotômico, foi avaliada por teste  $\chi^2$ , utilizando o programa StatPlus®, comparando os tratamentos com o grupo controle considerando resultado significativo para  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

Os resultados da taxa de prenhez estão apresentados na Figura 1.



**FIGURA 1:** Taxas de prenhez de receptoras de embriões produzidos *in vitro* nos três grupos experimentais ( $P>0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Nos animais do G1 houve 53,33% (8/15) de taxa de prenhez, nos animais do G2 houve 60% (12/20). Não houve diferença na taxa de prenhez entre os grupos ( $P>0,05$ ).

Aumentos na taxa de prenhez foram obtidos com a administração de 500 mg de bST no estro de vacas lactantes receptoras de embrião (MOREIRA et al., 2002a), em resposta ao aumento na concentração sérica de IGF-1 e somatotropina endógena (BILBY et al., 1999). Segundo Moreira et al., (2002a), estes aumentos na concentrações séricas de IGF-1 circulante podem, acelerar o desenvolvimento embrionário e aumentar o número de células trofoblásticas, resultando em incremento na secreção de IFN- $\tau$  pelo embrião.

Um ponto a ser analisado é que a aplicação do bST neste experimento foi realizada no momento da involução, evitando um manejo a mais do lote de receptoras somente para a aplicação do hormônio no dia do estro. No entanto, Moreira et al., (2002a) afirmaram que é importante um tempo prévio de exposição do útero à bST e IGF-1, antes da transferência dos embriões, em conjunto com a exposição dos embriões aos hormônios, durante o seu período crítico de desenvolvimento, para assim, proporcionar incremento na taxa de prenhez. Desta forma, observa-se que a administração de bST, durante o estro, garante um ambiente uterino capaz de estimular o desenvolvimento embrionário com consequente aumento na taxa de prenhez. Thatcher et al., (2006), observaram aumento na concentração de IFN- $\tau$  no fluido



uterino após a administração de 500mg de bST nas receptoras, utilizando embriões produzidos *in vivo* e vacas em lactação como receptoras.

Costa et al., (2011) relataram que a aplicação de 500mg, no dia do estro de receptoras de embrião não resultou no aumento da taxa de prenhez de embriões criopreservados produzidos *in vivo* citando que os danos causados pelo processo de criopreservação, que ocorrem no trofoderma e na massa celular interna, são responsáveis pela redução no número de células trofoblásticas do embrião e fragmentação da membrana nuclear, podendo ocorrer deficiência na expressão do gene que codifica a produção de INF- $\tau$  (LONERGAN et al., 2003), desse modo, a secreção de IFN- $\tau$  pode ser diminuída (DEMMERS et al., 2001), comprometendo os sinais do reconhecimento materno da gestação.

O IGF-I tem efeitos positivos sobre taxa de desenvolvimento embrionário (MOREIRA et al., 2002b; LIMA et al., 2006) e diminuição da apoptose (JOUSAN e HANSEN, 2004) em embriões produzidos *in vitro*. Todavia, Bertolini et al., (2002) concluíram que o processo de FIV afeta negativamente a quantidade da expressão gênica do embrião observadas no dia 7 de cultivo, inclusive à relacionada ao IFN- $\tau$ , além da taxa de desenvolvimento embrionário observado ao dia 16. Portanto, apesar do efeito benéfico da bST no desenvolvimento do embrião, é provável que as alterações na expressão gênica durante o processo de produção *in vitro* possam vir a ter como resultado, uma baixa capacidade para elevar a síntese de IFN- $\tau$  pelo embrião quando as receptoras são tratadas com bST não mostrando diferença significativa nas taxas de prenhez entre o grupo controle e o grupo tratado com bST.

A resposta ao bST, está também ligada às categorias animais que possuem diferenças metabólicas e fisiológicas. No caso de vacas lactantes, que possuem baixa concentração de IGF-1 em decorrência da lactação, a bST pode resultar em incrementos na concentração de IGF-1, corrigindo, assim, um desequilíbrio endócrino e metabólico elevando as taxas de prenhez (THATCHER et al., 2006). Em novilhas, as concentrações de IGF-1 foram superiores àquelas encontradas em vacas, podendo, dessa forma, não responder à aplicação de bST de modo satisfatório (BILBY et al., 1999). Portanto, vacas lactantes podem ser relativamente mais sensíveis e responsivas ao bST e IGF-1 que novilhas, influenciando favoravelmente no desenvolvimento e na sobrevivência dos embriões (THATCHER et al., 2006). No presente experimente onde se utilizou novilhas como receptoras a taxa de prenhez do grupo controle, do presente estudo, foi considerada de bom nível (53,33%), sendo assim, pode não ter sido proporcionada condições de níveis baixos de IGF-I que poderiam ter sido corrigidas com a

suplementação de através do bST não havendo diferenças com o grupo tratado com hormônio.

Quando se comparou as taxas de prenhez do G1 com 53,33% (8/15) e o G3 com 55% (11/20), não sendo observadas diferenças estatisticamente significativas ( $P>0,05$ ).

Elevados níveis de prostaglandina  $F2\alpha$  alfa ( $PGF2\alpha$ ) no lúmen uterino podem ser responsáveis por perdas embrionárias precoces (SCENNA et al., 2004). O endométrio bovino contém grandes quantidades de ácido araquidônico que podem ser facilmente convertidos para diferentes produtos como a  $PGF2\alpha$  (SALAMONSEN e FINDLAY, 1990) e o processo de transferência de embrião, onde há manipulação do trato reprodutivo da fêmea, tem sido responsabilizada por aumentar a liberação de  $PGF2\alpha$ , no lúmen uterino (WANN e RANDEL, 1990; VELEZ et al., 1991; SCENNA et al., 2005). A flunixinina meglumina (FM) é um potente inibidor das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) e, portanto inibe a produção de  $PGF2\alpha$  produzida no endométrio (SCENNA et al., 2005). Além disso, Lemaster et al., (1999) demonstraram que a administração de FM em vacas suplementadas com progestágeno e recebendo aplicações de ocitocina (para estimular a produção uterina de  $PGF2\alpha$  nos dias 5 a 8 após IA tiveram redução nas concentrações de prostaglandinas e similares taxas de concepção quando comparadas as vacas do grupo controle.

Como observado neste estudo a aplicação de um inibidor da formação da COX-1 e COX-2 não incrementou a taxa de prenhez das receptoras de embrião, discordando dos resultados de Elli et al., (2001) que reportaram aumento nas taxas de prenhez em novilhas que receberam 5mg de lisinato de ibuprofeno por kg, uma hora antes da transferência em comparação aos animais que não receberam o tratamento. Além disso, McNaughtan et al., (2002) afirmaram que novilhas que receberam 10mL de FM por via intramuscular, tiveram 1,22 mais chances de se tornarem prenhas quando comparadas as novilhas que serviram de controle. A administração de ácido acetilsalicílico ou FM a novilhas receptoras de embrião resultaram em aumento na taxa de prenhez e Purcell et al., (2005) relataram efeitos positivos na taxa de prenhez devido a aplicação de FM em receptoras de embrião, porém, tal resultado ocorreu somente em uma propriedade das três propriedades em que foram realizados os experimentos.

Schrick et al., (2001) relatam em seus estudos que um efeito significativo do FM pode estar correlacionado a algumas características embrionárias sobre a taxa de prenhez das receptoras, os quais constatam que o efeito do FM na taxa de prenhez depende e pode variar de acordo com a qualidade embrionária, estágio de desenvolvimento do embrião transferido e

tipo de embrião transferido (fresco ou congelado), como confirmado por Scenna et al., (2005) em seus estudos comparando a qualidade do embrião concluíram que o tratamento com FM não alterou as taxas de prenhez para embriões de qualidade I, melhorando somente as taxas de prenhez para embriões de qualidade II, e sugere que embriões de qualidade II são mais sensíveis aos efeitos deletérios da PGF2 $\alpha$ . Vale ressaltar que todos os trabalhos acima citados utilizaram embriões produzidos *in vivo*, submetidos à criopreservação ou não, diferentemente deste estudo em que trabalhou-se com embriões produzidos *in vitro* e de grau I.

Outra estratégia seria a utilização do FM no período crítico (dias 15 a 17 do ciclo estral), como recomendado por Guzeloglu et al. (2007) que alcançou 76,92% e 50% de taxa de prenhez após IA para o grupo tratado e controle, respectivamente, com duas doses de 1,1mg/kg com doze horas de intervalo no período crítico, aumentando assim a meia vida do FM, onde a aplicação do FM atuou bloqueando a formação de PGF2 $\alpha$  pelo endométrio e assim aumentando a sobrevivência embrionária auxiliando efeito antiluteolítico do conceito. No entanto, Erdem e Guzeloglu (2010) ao aplicarem meloxicam (antiflamatório com meia vida maior que a do FM) no período crítico após IA constatou efeito negativos na taxa de prenhez, que segundo os autores, o aumento na duração do tempo de bloqueio das COX-2 terminou atrasando a implantação do embrião ao endométrio, diminuindo a sobrevivência embrionária, sugerindo que um bloqueio em excesso das prostaglandinas no período crítico pode ter resultado negativos na taxa de prenhez.

## CONCLUSÃO

Portanto a aplicação da bST e FM em novilhas receptoras de embriões produzidos *in vitro*, no momento da transferência, não foi eficiente para o incremento na taxa de gestação, necessitando mais pesquisas em novas estratégias para alavancar os índices de sucesso e contribuir ainda mais para disseminação da biotecnologia.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, G. A.; FERNANDES, M. A.; KNYCHALA, R. M.; PEREIRA JUNIOR, M. V.; OLIVEIRA, A. J.; NUNES, D. P.; BONATO, G. L.; SANTOS, R. M. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.36, n.1, p.66-69, 2012.
- BERTOLINI, M.; BEAM, S. W.; SHIM, H.; BERTOLINI, L. R.; MOYER, A. L.; FAMULA, T. R.; ANDERSON, G. B. Growth, development, and gene expression by *in vivo* and

in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.63, n.3, p.318-328, November, 2002.

- BILBY, C. R.; BADER, J. F.; SALFEN, B. E.; YOUNGGUIST, R. S.; MURPHY, C. N.; GARVERICK, H. A.; CROOKER, B. A.; LUCY, M. C. Plasma GH, IGF-1, and conception rate in cattle treated with low doses of recombinant bovine GH. **Theriogenology**, v.51, n.7, p.1285-1296, 1999.
- BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v.56, n.9, p.1451-1463, 2001.
- COSTA, E. P.; MARQUES, P. A. F.; FERNANDES, C. A. C.; MACEDO, G. G.; SANTOS, G. M.; ALMEIDA NETO, J. R. M.; PEREIRA, E. C. M. Uso da rbs no dia do estro em receptoras de embrião bovino criopreservado. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.12, n.4, p.712-717, out./dez. 2011.
- DIAS, C. C.; ALVIN, M. T. T.; SALIBA.; W. P.; VASCONCELOS, J. L. M. Fatores relacionados ao embrião e à receptora que influenciam o sucesso das transferências de embriões de coleta convencional ou de fertilização in vitro. **Acta Scientiae Veterinariae**, Resumo, v.34, p.412, 2006.
- ELLI, M.; GAFFURI, B.; FRIGERIO, A.; ZANARDELLI, M.; COVINI, D.; CANDIANI, M.; VIGNALI, M. Effect of a single dose of ibuprofen lysinate before embryo transfer on pregnancy rates in cows. **Reproduction**, v.121, n.1, p.151-154, 2001.
- ERDEM, H; GUZELOGLU, A. Effect of Meloxicam Treatment during Early Pregnancy in Holstein Heifers. **Reproduction Domestic Animals**, v.45, n.8, p.625-628, 2010.
- FARIN, P. W.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.151-170, 2001.
- GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SIQUEIRA, L. C.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção in vitro de embriões bovinos. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife-PE, v.11, s.1, p.135-138, abril, 2008.
- GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H.; VALE, W. G. **Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos**, São Paulo, Varela, 2005, 560p.
- GUZELOGLU, A.; ERDEM, H.; SARIBAY, M. K.; THATCHER, W. W.; TEKELI, T. Effect of the administration of flunixin meglumine on pregnancy rates in Holstein heifers. **Veterinary Records**, v.160, n.12, p.404-406, 2007.
- HAAS, G. T. S.; FERNANDES, C. A. C.; COSTA, E. P.; TORRES, C. A. A.; MARQUES, P. A. F.; LOPES, F. G.; PAULA, T. A. R. Taxa de prenhez e concentração sérica de

progesterona em novilhas receptoras de embrião tratadas com somatotropina recombinante bovina (rbst). **Revista Ceres**, v.54, n.311, p.26-32, 2007.

- HANSEN, P. J. Realizing the promise of IVF in cattle--an overview. **Theriogenology**, v.65, n.1, p.119-125, 2006.
- HASLER, J. F. In vitro culture of bovine embryos in Ménézo's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p.81-91, 2000.
- HASLER, J. F.; BILBY, C. R.; COLLIER, R. J.; DENHAN, S. C.; LUCY, M. C. Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. **Theriogenology**, v.59, n.9, p.1919-1928, 2003.
- JOUSAN, F. D.; HANSEN, P. J. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. **Biology of Reproduction**, v.71, n.5, p.1665-70, 2004.
- DEMMERS, K. J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. **Reproduction**, v.121, n.1, p.41-49, 2001.
- LANE, M.; GARDNER, D. K.; HASLER, M. J.; HASLER, J. F. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. **Theriogenology**, v.60, n.3, p.407-419, 2003.
- LEMASTER, J. W.; SELOS, R. C.; HOPKINS, F. M.; SCHRICK, F. N. Effects of administration of oxytocin on embryonic survival in progestogen supplemented cattle. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v.57, n.4, p.259-268, 1999.
- LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A.; SANTOS, M. H.; REICHENBACH, H. D.; WEPPERT, M., PAULA LOPES, F. F.; NETO, C. C.; GONÇALVES, P. B. Effect of retinoids and growth factor on in vitro bovine embryos produced under chemically defined conditions. **Animal Reproduction Science**, v.95, n.3-4, October, p.184-192, 2006.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; MOREIRA, A. M.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression on bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. **Biology Reproduction**, v.69, n.4, p.1424-1431, 2003.
- McNAUGHTAN, J. W.; YELLAND, R. J.; LINGARD, S.; ABEL, A.; SILCOX, R. W. The effect of prostaglandin inhibitor on pregnancy rates of heifer embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v.57, p.551, 2002.

- MOREIRA, F.; BADINGA, L.; BURNLEY, C.; THATCHER, W. W. Effects of bovine somatotropin on embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 55, p. 367 (Abstract), 2001.
- MOREIRA, F.; BADINGA, L.; BURNLEY, C.; THATCHER, W. W. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. **Theriogenology**, v.57, n.4, p.1371-1387, 2002a.
- MOREIRA, F.; PAULA LOPES, F. F.; HANSEN, P. J.; BADINGA, L.; THATCHER, W. W. Effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.57, n.2, p.895-907, 2002b.
- PALMA, G. A. **Biología de la reproducción**. Balcarce: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária, 2001, 701p.
- PURCELL, S. H.; BEAL, W. E.; GRAY, K. R. Effect of a CIDR insert and flunixin meglumine administered at the time of embryo transfer on pregnancy rate and resynchronization of estrus in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.64, n.4, p.867-878, 2005.
- SANTOS, J. E.; JUCHEN, S. O.; CERRI, R. L.; GALVÃO, K. N.; CHEBEL, R. C.; THATCHER, W. W.; DEI, C. S.; BILBY, C. R. Effect of bST and reproductive management on reproductive and lactational performance of Holstein dairy cows. **Journal Dairy Sciency**, v.87, n.4, p.868-881, 2004.
- SCHMIDT M. Perinatal death associated with ET, IVP and cloning in cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.49, p.13, 2007.
- SCHRICK, F. N.; HOCKETT, M. E.; TOWNS, T. M.; SAXTON, A. M.; WERT, N. E.; WEHRMAN, M. E. Administration of a prostaglandin inhibitor immediately prior to embryo transfer improves pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, v.55 (Suppl.), p.370, 2001.
- SALAMONSEN, L. A.; FINDLAY, J. K. Regulation of endometrial prostaglandins during the menstrual cycle and in early pregnancy. **Reproduction, Fertility and Development**, v.2, n.5, p.443-457, 1990.
- SCENNA, F. N.; HOCKETT, M. E.; TOWNS, T. M.; SAXTON, A. M.; ROHRBACH, N. R.; WEHRMAN, M. E.; SCHRICK, F. N. Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. **Prostaglandins Other Lipid Mediators**, v.78, n.1-4, p.38-45, 2005.

- SCENNA, F. N.; EDWARDS, J. L.; ROHRBACH, N. R.; HOCKETT, M. E.; SAXTON, A. M.; SCHRICK, F. N. Detrimental effects of prostaglandin F<sub>2</sub>α on preimplantation bovine embryos. **Prostaglandins Other Lipid Mediators**, v.73, n.3-4, p.215-226, 2004.
- THATCHER, W. W.; BILBY, T. R.; BARTOLOME, J. A.; SILVESTRE, F.; STAPLES, C. R.; SANTOS, J. E. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. **Theriogenology**, v.65, n.1, p.30-44, 2006.
- THATCHER, W. W.; BILBY, T. R.; GUZELOGLU, A. Utilização de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) como estratégia para aumentar a taxas de prenhez em vacas leiteiras em lactação. In: VIII Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos, Uberlândia, 2004. **Anais... CONAPEC**. 2004, p.03-17.
- VELEZ, J. S., RANDEL, R. D., NEUENDORFF, D. A. Effect of uterine manipulation on postpartum fertility and plasma 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F<sub>2</sub> in Brahman cows and first-calf heifers. **Theriogenology**, v.36, n.6, p.987-997, 1991.
- WANN, R. A.; RANDEL, R. D. Effect of uterine manipulation 35 days after parturition on plasma concentrations of 13, 14-dihydro-15-keto prostaglandin F<sub>2</sub> in multiparous and primiparous brahman cows. **Journal of Animal Science**, v.68, n.5, p.1389-1394, 1990.
- WRIGHT J. M. Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality scores. In: Stringfellow DA, Seidel SM (Ed.). **Manual of the International Embryo Transfer Society**. 3.ed. Savoy, IL: IETS, 1998. p.167-170.

## ARTIGO II

---

### PARÂMETROS QUE AFETAM A TAXA DE PRENHEZ EM RECEPTORAS BOVINAS DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*

**Veloso Neto, H. F.; Pereira, L. C.; Andrade, J. C. O.; Souza, B. P. A.; Oliveira, M. A. L.;  
Lima P. F.**



## **Parâmetros que afetam a taxa de prenhez em receptoras bovinas de embriões produzidos *in vitro***

Parameters affecting the pregnancy rate in recipients of bovine embryos produced in vitro

**VELOSO NETO, Humberto Fernandes<sup>1</sup>; PEREIRA, Lucas Carvalho<sup>1</sup>; ANDRADE, Joaquim Correia de Oliveira<sup>2</sup>; SOUZA, Bartira Pastor de Andrade<sup>2</sup>; OLIVEIRA, Marcos Antônio Lemos<sup>3</sup>; LIMA, Paulo Fernandes<sup>3</sup>**

### **RESUMO**

Com o advento das novas biotecnologias as falhas relacionadas à mortalidade embrionária precoce, tornaram-se mais evidentes, principalmente devido a defeitos intrínsecos do embrião, sendo que quanto maior o grau de artifícios da técnica utilizada, maiores são as perdas embrionárias. Com esta pesquisa, objetivou-se avaliar taxas de prenhez de embriões produzidos *in vitro*, determinando os efeitos da variação do grau de desenvolvimento do embrião, sincronia da receptora com o embrião e classificação do corpo lúteo. Foram utilizadas 134 novilhas como receptoras de embriões produzidos *in vitro*. A taxa de prenhez foi avaliada segundo grau de desenvolvimento da estrutura transferida, sincronia do embrião com a receptora, e tamanho corpo lúteo. Embriões desenvolvidos (Bl, Blx, Ble) apresentaram melhores índices de prenhez que embriões jovens (Mo, Bli), 57,14% e 25% respectivamente ( $P < 0,05$ ). Sincronia embrião com a receptora -1 (68,42%); 0 (88,88% ); +1(41,5% ) para  $P < 0,05$  e tamanho do corpo lúteo CL1 grande 46,83%, CL2 médio 55,88%, CL3 pequeno 42,85% ( $P > 0,05$ ). Conclui-se que para um programa de transferência de embriões oriundos de FIV, é necessário para se obter bons índices de prenhez, a sincronia do embrião com a receptora e o grau do desenvolvimento do embrião inovulado, não sendo de relevância a projeção do corpo lúteo e sim sua identificação à palpação.

**Termos de indexação:** sincronia, corpo lúteo, FIV

### **ABSTRACT**

The advent of new biotechnologies failures related to early embryonic mortality, became more evident, mainly due to intrinsic defects of the embryo, and the higher the degree of artifacts of the technique used, the greater the embryo losses. This research aimed to evaluate pregnancy rates of in vitro produced embryos, determining the effects of variation in the

<sup>1</sup> Méd. Vet., Pós graduação em Ciência Veterinária-UFRPE.

<sup>2</sup> Méd.Vet., Msc. Nordeste InVitro.

<sup>3</sup> Méd. Vet., Dr. Prof. Associado, UFRPE, Depto. de Medicina Veterinária. Av. Dom Manuel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE.  
Ciência Veterinária nos Trópicos

degree of development of the embryo, synchrony between the recipient and embryo and classification of the corpus luteum 134 heifers were used as recipients of embryos produced *in vitro*. The pregnancy rate was evaluated according to the degree of development of the structures transferred embryo synchrony with recipient and corpus luteum size. Embryos developed (Bl, Blx, Ble) showed better pregnancy rates than younger embryos (Mo, Bli), 57.14% and 25% respectively ( $P < 0.05$ ). Synchrony with the recipient embryo -1 (68.42%) 0 (88.88%); +1 (41.5%) for  $P < 0.01$  and size of the corpus luteum large 46.83% CL1, CL2 average 55.88%, 42.85% CL3 small ( $P > 0.05$ ). It is concluded that a program to transfer embryos derived from FIV, it is necessary to obtain better pregnancy rates in synchrony between recipient and embryo, and the degree of embryo development, not being relevant size of the corpus luteum but their identification on palpation.

**Index terms:** synchrony; corpus luteum; IVF

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da pecuária nacional está associado às ferramentas de melhoramento genético utilizadas nos rebanhos, o Brasil é detentor de um bom nível técnico-científico das biotécnicas aplicadas à reprodução animal e tem destacado-se como um dos maiores produtores de embriões *in vitro*, não só pelo domínio da técnica, mas pela qualidade do nosso rebanho, principalmente no tocante a gado de corte (VIEIRA, 2012).

Na última década, a fertilização *in vitro* (FIV) surgiu como uma alternativa à superovulação e tornou-se a técnica de escolha para a produção de embriões de bovino, especialmente em raças zebuínas (VIANA et al., 2012). A expansão da produção *in vitro* (PIV) em bovinos tem permitido o uso de grande número de embriões para pesquisa. Esta atividade se expandiu no Brasil com a instalação de várias empresas aplicando a aspiração folicular (OPU) e PIV comercialmente (RUBIN et al., 2009).

Com o advento das novas biotecnologias as falhas relacionadas a mortalidade embrionária precoce, se tornaram mais evidentes, principalmente devido a defeitos intrínsecos do embrião, sendo que quanto maior o grau de artifícios da técnica utilizada, maiores são as perdas embrionárias (SARTOR e DODE, 2008).

A variabilidade do sucesso das transferências de embriões produzidos *in vitro* ainda é um dos entraves para sua expansão, e alguns dos problemas são relacionados com as receptoras (ANDRADE et al., 2012). Diversos estudos são realizados em programas de transferências de embriões com objetivo de determinar critérios para melhores taxas de

gestação com observação de qualidade e grau de desenvolvimento do embrião, sincronia embrião ou doadora com as receptoras e qualidade do corpo lúteo, porém, em sua maioria utilizando embriões produzidos *in vivo* (HASLER et al., 1987; SPELL et al., 2001; DIAS et al., 2006; PEIXOTO et al., 2007; LEAL et al., 2009; ANDRADE et al., 2012).

Com esta pesquisa, objetivou-se avaliar taxas de prenhez de embriões produzidos *in vitro*, determinando os efeitos da variação do grau de desenvolvimento do embrião, sincronia da receptora com o embrião e classificação do corpo lúteo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Doadoras zebuínas foram selecionadas para coleta de oócitos, a aspiração folicular foi realizada pela técnica de aspiração transvaginal guiada por ultrassom, (OPU-*Ovum Pick-Up*). Os ovócitos aspirados eram classificados quanto à qualidade em graus de 1 a 4 (PALMA, 2001) e transportados ao laboratório (InVitro<sup>®</sup>) em meio Tissue Culture Medium (TCM 199) tamponado com HEPES, com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>, à temperatura de 38,5° C em incubadoras portáteis. Ao chegarem ao laboratório, foram maturados, fertilizados e cultivados sob ambiente controlado. Após a produção, os embriões foram classificados, sendo utilizados apenas os de grau 1 – excelente/bom, e a fresco (WRIGHT, 1998).

Foram utilizadas 134 receptoras, novilhas com peso médio de 350 kg, mestiças (Red Angus x Zebu) provenientes da Fazenda Engenho Ocidental – Zona da Mata Sul de Pernambuco. Avaliadas pelo estado geral, conformação, peso, escore corporal e presença de infestação por ectoparasitas, além da avaliação ginecológica segundo Grunert et al. (2005). Todas as novilhas receberam vacinas contra brucelose quando bezerras. Os animais receberam manejo nutricional, constituído do fornecimento de pasto plantado (*Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha* cv. GM5), sal mineralizado com suplemento protéico e água *ad libitum*.

O protocolo de sincronização de estro para transferência de embrião foi realizado da seguinte forma: no dia 0, insere-se o dispositivo intravaginal de progestágeno, com administração intramuscular de 2 mg de Benzoato de estradiol, no dia 7 é administrado 200 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (ECG) e 0,150 mg de D-Cloprostenol, no D8 procede-se a retirada do dispositivo, e 0,5 mg de benzoato de estradiol por via intramuscular; e inicia-se a observação de cio no dia 9, dia 10 e dia 11 e no dia 17 procede-se a inovulação em tempo fixo.

Imediatamente antes da inovulação, as receptoras foram avaliadas por palpação retal para confirmar a presença do corpo lúteo e o respectivo ovário de qual ovularam. O corpo

lúteo das receptoras era palpado e classificado conforme seu tamanho em: grande ou mais de um CL (CL1), médio (CL2) e pequeno ou incluso (CL3), segundo Leal et al. (2009). Os embriões produzidos *in vitro* foram transferidos no terço final do corno uterino ipsilateral ao ovário com corpo lúteo presente. A transferência dos embriões foi realizada por técnicos especializados, pelo método transcervical (não cirúrgico).

A sincronia entre embrião/receptora foi definida como: Sincronia -1: a receptora deu cio um dia depois da FIV; Sincronia 0: a receptora deu cio no dia da FIV; e Sincronia +1: a receptora deu cio um dia antes da FIV. Foram analisadas outras variáveis como estágio de desenvolvimento do embrião onde definiu-se como estágio inicial, Mórula e blastocisto inicial (Mo, Bli) e estágio avançado blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido (Bl, Blx, Ble), segundo Fonseca et al. (2001). O diagnóstico de prenhez foi realizado entre 30 e 35 dias após a inovulação, por ultrassonografia com aparelho Mindray® DP2200Vet.

A variável taxa de prenhez, sendo um parâmetro qualitativo dicotômico, foi avaliada por Teste Exato de Fischer, utilizando o software Graphpad Instat. Foram incluídos no modelo os efeitos do desenvolvimento do embrião, da qualidade do CL e da sincronia embrião/receptora, sobre a taxa de prenhez.

## **RESULTADOS**

Foram transferidos 134 embriões obtendo 65 prenhezes, uma taxa de 48,5%. As taxas de prenhez em relação às variáveis estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Efeitos do grau de desenvolvimento embrionário, sincronia da receptora com embrião e qualidade do corpo lúteo sobre a taxa de prenhez em receptoras mestiças de embriões fertilizados *in vitro*.

Classe	Taxa de prenhez	
	Valor absoluto	Valor relativo (%)
<b>Desenvolvimento do embrião</b>		
Embriões jovens (Mo, Bli)	(9/36)	25,0% <sup>A</sup>
Embriões desenvolvidos (Bl, Blx, Ble)	(56/98)	57,14% <sup>B</sup>
<b>Sincronia</b>		
-1	(13/19)	68,42% <sup>A</sup>
0	(8/9)	88,88% <sup>A</sup>
+1	(44/106)	41,5% <sup>B</sup>
<b>Qualidade corpo lúteo</b>		
CL1	(37/79)	46,83% <sup>NS</sup>
CL2	(19/34)	55,88% <sup>NS</sup>
CL3	(9/21)	42,85% <sup>NS</sup>

Letras diferentes entre linhas indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). NS – não significativo ( $P > 0,05$ ). Mo - Mórula; Bli - Blastocisto inicial; Bl - Blastocisto; Blx -Blastocisto expandido; Ble - Blastocisto eclodido. Sincronia -1: a receptora deu cio um dia depois da fertilização *in vitro* (FIV); Sincronia 0: a receptora deu cio no dia da FIV; e Sincronia +1: a receptora deu cio um dia antes da FIV. CL1 grande ou mais de um, CL2, médio CL3 pequeno ou incluso.

## DISCUSSÃO

Neste trabalho obteve-se uma taxa de prenhez de 48,5 %. Existem vários relatos na literatura de taxa de prenhez de embriões bovinos produzidos *in vitro*, com médias variando de 30 a 51% (HASLER, 2000; FARIN et al., 2001; LANE et al., 2003; DIAS et al., 2006; SCHMIDT, 2007, ANDRADE et al., 2012), com alta variabilidade e que são mais baixas quando comparadas as taxas obtidas com embriões produzidos *in vivo* (HASLER et al., 2003). Farin et al., (2001) relataram que no dia 17 da gestação, 19% dos embriões produzidos *in vitro* estavam degenerados, sugerindo que os embriões produzidos *in vitro* podem ser deficientes em iniciar os mecanismos essenciais para o reconhecimento materno da prenhez com isso menores taxas de prenhez. Semelhante ao que ocorre nos embriões *in vivo*, a perda dos

embriões *in vitro* é mais alta nos primeiros 21 dias de gestação, sendo que a maioria ocorre nos dias 14 e 15 ou uma semana após a transferência (McMILLAN et al., 1997).

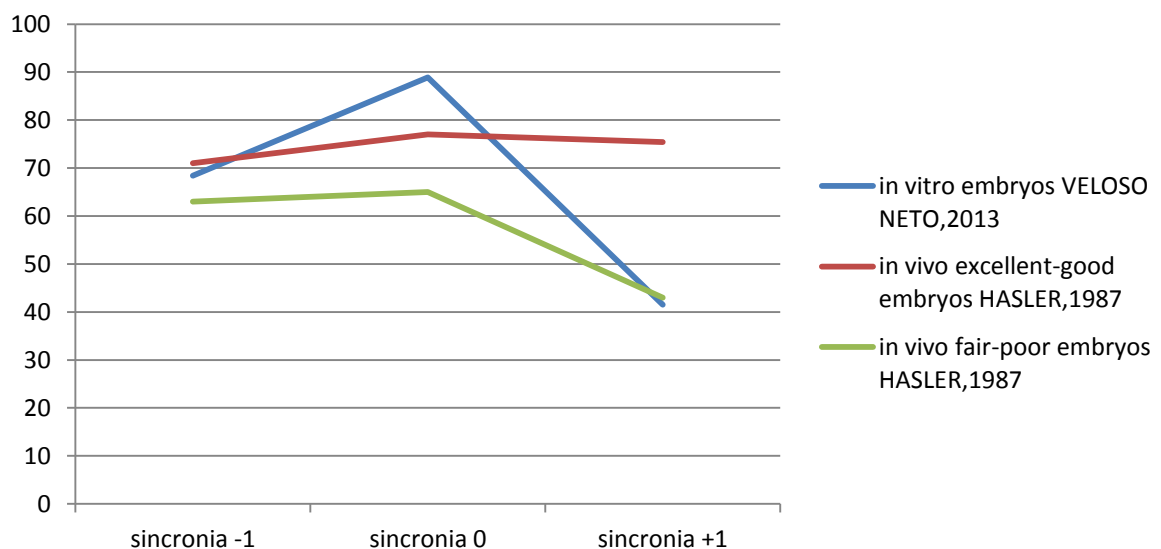
Observou-se neste estudo uma taxa de prenhez maior para embriões desenvolvidos (Bl, Blx, Ble) em relação aqueles em estágio inicial de desenvolvimento (Mo, Bli), 57,14% e 25% ( $p < 0,05$ ) respectivamente, porém Bó et al., (2012) em seus estudos concluíram que as melhores taxas de prenhez são obtidas com inovulações de estágios precoces de desenvolvimento embrionários, como mórulas e blastocistos iniciais em concordância com Hanekamp (1999) e Peixoto et al. (2007), apesar da literatura preconizar o blastocisto como estrutura ideal para transferência, afirmando que taxas de sucesso podem ser menores para estágios muito precoces ou muito tardios (JAINUDEEN et al., 2004), no entanto o trabalho de Peixoto et al. (2007), Hanekamp (1999) e Bó et al. (2012), as taxas de prenhez de embriões foram avaliados de embriões oriundos de produção *in vivo*, onde os resultados divergiram dos embriões produzidos *in vitro*. A produção *in vitro* expõe os embriões a uma grande variedade de estresse que normalmente não ocorrem no desenvolvimento *in vivo*, mesmo com os mais eficientes sistemas de cultivo, grande proporção de zigotos apresenta falhas de desenvolvimento e diferentes padrões de expressão de importantes genes (FONTANIER-RAZZAQ et al., 2001).

Embriões de ruminantes têm o desenvolvimento até o estágio de oito células semelhante, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Porém, a partir deste momento, ocorre a ativação do genoma embrionário, quando o desenvolvimento *in vitro* passa a ser mais lento (THOMPSON, 2000), além de que o cultivo pode exercer efeito significativo sobre o metabolismo embrionário, alterando a qualidade do embrião (RIZOS et al., 2002) acarretando diferenças bioquímicas e metabólicas, e conseqüentemente podem afetar os resultados da taxa de prenhez após a transferência (HASLER et al., 2003). No presente estudo, os embriões foram transferidos no D7 pós FIV, com resultados mais baixos para embriões que se encontraram em estágios iniciais no dia da transferência, onde esta delonga no desenvolvimento destes embriões pode sinalizar um possível comprometimento desenvolvimento decorrente do processo de fecundação e/ou cultivo *in vitro*, prejudicando o início de mecanismos essenciais para o reconhecimento materno da prenhez.

A sincronia do embrião com a receptora foi outro parâmetro que influenciou a taxa de prenhez, onde neste trabalho observaram-se melhores taxas ( $P < 0,05$ ) quando a receptora apresentou estro no dia em que ocorreu a FIV (88,88% na sincronia 0) e receptoras que apresentaram estro um dia depois da FIV (68,42%, sincronia -1) corroborando com

Andrade et al. (2012). Todavia, Dias et al. (2006), Peixoto et al. (2007), Hasler et al. (1987), que consideram como pré-requisito a sincronização do embrião com trato reprodutivo da receptora, e que trabalharam com embriões produzidos *in vivo* afirmam que para bons resultados a receptora tem apresentar o estro, no momento do estro da doadora e para receptoras que apresentaram estro um dia antes do estro da doadora, onde Andrade et al. (2012), faz uma equivalência do dia da FIV com o dia do estro da doadora, para efeito de comparação.

A discordância dos resultados são mostradas com relação aos trabalhos que utilizaram para as transferências embriões produzidos *in vivo*, portanto, para embriões produzidos *in vitro*, um ponto a ser observado para programas de transferências será a sincronia 0, e -1 objetivando uma maior taxa de sucesso. Hasler (1987) descreveu que embriões produzidos *in vivo*, mas de qualidade inferior, apresentaram melhores resultados na sincronia 0 e -1, semelhante aos embriões fertilizados *in vitro* (FIGURA 1). Logo, embriões mais sensíveis são melhor aproveitados quando existe a sincronia 0 ou a receptora apresentou estro um dia depois da doadora ou da FIV. Talvez, o que possa justificar tal comportamento, seja que a receptora inovulada com embrião em sincronia -1 demore um dia a mais para chegar ao período crítico do ciclo estral, por volta do dia 15 ao dia 17, onde se inicia o mecanismo de luteólise (BINELLI et al., 2001), dando assim uma margem de tempo para o embrião produzido *in vitro*, iniciar o mecanismo de reconhecimento materno da gestação (FIGURA 2).

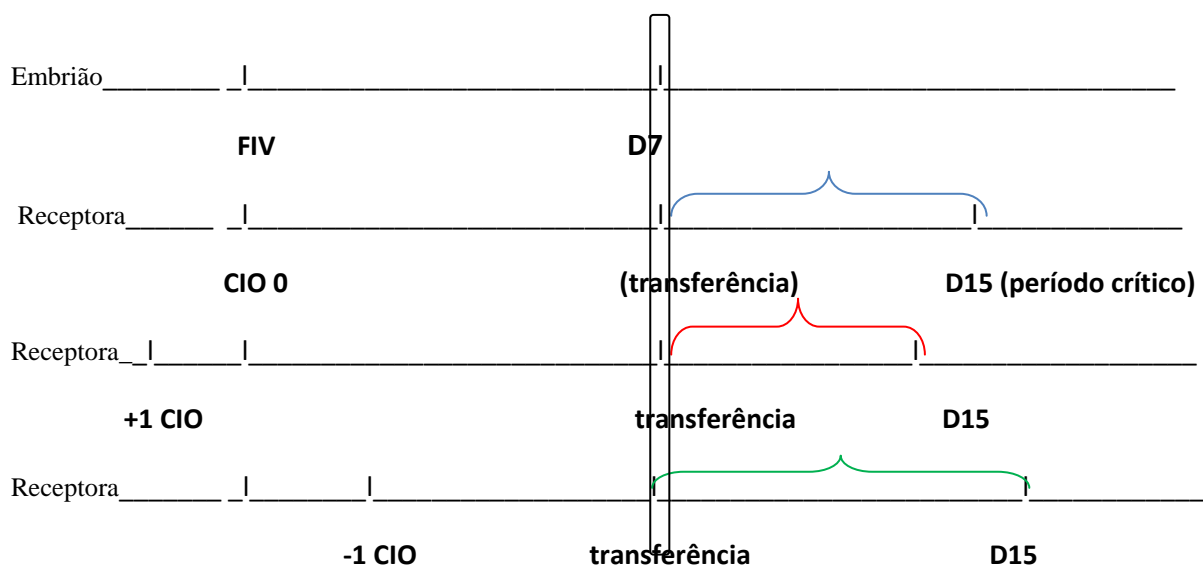


**FIGURA 1:** Percentagem de prenhez em relação a sincronia do embrião, onde Sincronia -1. Receptora apresentou estro um dia depois da fertilização *in vitro*, ou do estro da doadora, no caso de embriões produzidos *in vivo*; Sincronia 0 a receptora apresentou estro no dia da FIV do embrião; Sincronia +1 a receptora apresentou estro um dia antes da FIV.

Com relação ao tamanho do corpo lúteo (CL) palpado foi observado que não houve diferença ( $P>0,05$ ) para as taxas de prenhez, concordando com Vieira et al. (2002) e Leal et al. (2009). Estes últimos autores afirmam que CLs maiores produziram maiores quantidade de progesterona quando comparados aos pequenos e médios, porém não há diferença nas taxas de prenhez. Fernandes e Barros (1996) demonstraram que a escolha das receptoras de embrião pela projeção de CL não é adequada, pois CL com projeção pequena pode apresentar uma porção grande interna no estroma ovariano, enquanto que CL com projeção maior pode apresentar massa luteal total pequena, assim a projeção nem sempre está relacionada ao tamanho real do CL. Spell et al. (2001), classificaram os CLs em excelentes ou bons (diâmetro palpável  $>10\text{mm}$  e consistência firme 66%) e ruins (diâmetro palpável  $<10\text{mm}$  e textura macia 33%) sem haver diferença nas taxas de prenhez concluindo que para seleção de uma receptora é necessário observação de estro e um CL palpável.

## CONCLUSÃO

Em um programa de transferência de embriões oriundos de FIV, é necessário para a obtenção de bons índices de prenhez, a observação da sincronia do embrião com a receptora, e o grau do desenvolvimento do embrião inovulado, não sendo de relevância a classificação do corpo lúteo e sim sua identificação à palpação.



**FIGURA 2:** Representação esquemática do tempo da ocorrência do cio para o início do período crítico (início da produção de  $\text{PGF2}\alpha$  para luteólise), em cada grupo da sincronia de receptoras.



## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, G. A.; FERNANDES, M. A.; KNYCHALA, R. M.; PEREIRA JUNIOR, M. V.; OLIVEIRA, A. J.; NUNES, D. P.; BONATO, G. L.; SANTOS, R. M. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.36, n.1, p.66-69, 2012.
- BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v.56, n.9, p.1451-1463, 2001.
- BÓ, G. A.; PERES, L. C.; CUTAIA, L. E.; PINCINATO, D.; BARUSELLI, P. S.; MAPLETOFT, R. J. Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24, n.1, p.272-277, 2012.
- DIAS, C. C.; ALVIN, M. T. T.; SALIBA, W. P.; VASCONCELOS, J. L. M. Fatores relacionados ao embrião e à receptora que influenciam o sucesso das transferências de embriões de coleta convencional ou de fertilização *in vitro*. **Acta Scientiae Veterinariae**, Resumo, v.34, p.412, 2006.
- FARIN, P. W.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.151-170, 2001.
- FERNANDES, C. A. C.; BARROS, J. N. P. Características do corpo lúteo e taxa de gestação em receptoras de embrião. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v.24, p.205, 1996.
- 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.
- FONTANIER-RAZZAQ, N.; MCEVOY, T. G.; ROBINSON, J. J.; REES, W. D. DNA damaging agents increase gadd153 (CHOP-10) messenger RNA levels in bovine preimplantation embryos cultured *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.64, n.5, p.1386-1391, may, 2001.
- GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H.; VALE, W. G. **Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos**, São Paulo, Varela, 2005, p. 170-175.
- HANEKAMP, W. J. A. Transfer of beef embryos in dairy cows: influence of recipient and embryo quality on pregnancy rate and calving performance. **Reproduction of Domestic Animals**, v.34, n.6, p.459-463, 1999.

- HANSEN, P. J. Realizing the promise of IVF in cattle--an overview. **Theriogenology** v.65, n.1, p.119-125, 2006.
- HASLER, J. F.; McCAULEY, A. D.; LATHROP, W. F.; FOOTE, R. H. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in large-scale bovine embryo transfer program. **Theriogenology**, v.27, n.1, p.139-168, January, 1987.
- HASLER, J. F. In vitro culture of bovine embryos in Ménézo's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p.81-91, 2000.
- HASLER, J. F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, v.56, n.9, p.1401-1415, 2001.
- HASLER, J. F.; BILBY, C. R.; COLLIER, R. J.; DENHAN, S. C.; LUCY, M. C. Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. **Theriogenology**, v.59, n.9, p.1919-1928, 2003.
- JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E. Indução da ovulação, Produção e transferência de embriões. In: HAFEZ, ESSE; HAFEZ, B. **Reprodução Animal** Ed Manole 7ª edição SP, 2004.
- LANE, M.; GARDNER, D. K.; HASLER, M. J.; HASLER, J. F. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. **Theriogenology**, v.60, n.3, p.407-419, 2003.
- LEAL, L. S.; OBA E.; FERNANDES, C. A. C; SÁ FILHO, O. G. Avaliação do corpo lúteo,contratilidade uterina e concentrações plasmáticas de progesterona e estradiol em receptoras de embriões bovinos. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.10, n.1, p.174-183, 2009.
- McMILLAN, W. H.; PETERSON, A. J.; HALL, D. R. H.; DONNISON, M. J. Embryo and recipient contributions to embryo loss to day 60 in heifers receiving either one or two in vitro-produced embryos. **Theriogenology**, v.47, p.370, 1997.
- PALMA, G. A. **Biotechnología de la reproducción**. Balcarce: Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, 2001, 701p.
- PEIXOTO, M. G.; BERGMANN, J. A.; SUYAMA, E.; CARVALHO, M. R.; PENNA, V. M. Logistic regression analysis of pregnancy rate following transfer of *Bos indicus* embryos into *Bos indicus* and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology** v.67, n.2, p.287-292, 2007.

- PONTES, J. H.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B. V.; ERENO-JUNIOR, J. C.; UVO, S.; BARREIROS, T. R.; OLIVEIRA, J. A.; HASLER, J. F.; SENEDA, M. M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v.71, n.4, p.690-697, 2009.
- RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction Development**, v.61, n.2, p.234-248, 2002.
- RUBIN, M. I. B.; PESSOA, G. A.; FRAGA, D. R.; VASCONCELOS, F. F.; SILVA, C. A. M. Produção *in vitro* de embriões e Clonagem: um caminho conhecido? **Revista Brasileira de Reprodução Animal** (Supl), Belo Horizonte, n.6, p.77-85, dez. 2009.
- SARTORI, R.; DODE, M. A. N. Mortalidade embrionária na IA, TE, FIV e clonagem In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3, 2008, Londrina-PR. p.175-194, **Anais...** Londrina-UEL, 2008.
- SCHMIDT, M. Perinatal death associated with ET, IVP and cloning in cattle. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.49 (Suppl 1), p.13, 2007.
- SPELL, A. R.; BEAL, W. E.; CORAH, L. R.; LAMB, G. C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, v.56, n.2, p.287-297, 2001.
- THOMPSON, J. G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.263-275, 2000.
- VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHAO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. **Animal Reproduction**, v.9, n.1, p.12-18, Jan./Mar. 2012.
- VIEIRA, R. C.; FRANCO, R. V. R.; DINIZ, E. G.; JACOMINI, J. O. Relação entre a morfologia do corpo lúteo e índices de prenhez em receptoras de embriões bovinos. **Bioscience Journal**, v.18, n.2, p.99-102, December, 2002.
- VIEIRA, R. J. Biotécnicas aplicadas à reprodução bovina: generalidades. **Ciência Animal**, vol.22, n.1 p.55-65, 2012.
- WRIGHT, J. M. Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality scores. In: Stringfellow DA, Seidel SM (Ed.). **Manual of the International Embryo Transfer Society**. 3.ed. Savoy, IL: IETS, 1998. p.167-170.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Em consideração ao conteúdo dissertado, pode se afirmar que ainda não existe uma forma pragmática de elevar os índices de gestação em receptoras de programas de transferência para embriões que foram produzidos *in vitro*. Se faz mister atentar a um conjunto de práticas criteriosas de seleção e manejo tanto de receptoras como de embriões, visando diminuir as perdas embrionárias no campo. A utilização de terapias antiluteolíticas analisadas neste trabalho deve ser extensamente pesquisada para aplicações nessa classe de embriões, fundamentando o conhecimento para melhorar os resultados e promover o melhoramento genético do rebanho brasileiro.