

CAPACIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE BLASTOCISTOS BOVINOS ORIUNDOS DO CULTIVO *IN VITRO* DE MÓRULAS DE BAIXA QUALIDADE PRODUZIDAS *IN VIVO*¹

MELISSA MENEGHEL², ALFREDO S CASTRO NETTO², RAFAEL HERRERA ALVAREZ³

¹Recebido para publicação em 06/12/06. Aceito para publicação em 02/05/07.

²Clinica Veterinária Garça SC Ltda, Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros, Km 416, Caixa postal 34, CEP 17400-000, Garça, SP, Brasil. E-mail: mmeneghel@uol.com.br

³Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Genética e Reprodução Animal, Instituto de Zootecnia, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Rua Heitor Penteadado, 56, Centro, Caixa postal 60, 13460-000, Nova Odessa, SP, Brasil.

RESUMO: Os embriões de baixa qualidade (Grau 3) representam uma considerável percentagem do total de embriões recuperados de vacas superovuladas. Esses embriões são raramente transferidos em receptoras, pois a taxa de prenhez é baixa. O presente estudo objetivou avaliar se blastocistos originados de mórulas Grau 3 cultivadas *in vitro* podem promover índices aceitáveis de prenhez quando transferidos em receptoras. Embriões (mórulas e blastocistos Graus 1, 2 e 3) foram recuperados de doadoras *B. taurus taurus* e *B. taurus indicus* superovuladas e transferidos em receptoras imediatamente após a coleta. Mórulas Grau 3 foram cultivadas nos meios PBS (adicionado de 10% de soro fetal bovino) ou Holding Plus™ durante 24 horas a 38 °C. Os blastocistos originados neste período foram igualmente transferidos em receptoras. O diagnóstico de prenhez foi realizado 60 dias após a transferência e os dados foram analisados por regressão logística. A qualidade do embrião foi a única variável que mostrou efeito significativo ($P < 0,05$) no índice de prenhez. Blastocistos originados de mórulas Grau 3 apresentaram taxa de prenhez de 45,7% contra 17,7% de mórulas Grau 3 transferidas imediatamente após a coleta ($P < 0,05$). A taxa de prenhez dos blastocistos cultivados classificados como Grau 1 e 2 foi de 75,0% e 57,9% respectivamente, enquanto que os classificados como Grau 3 foi de 21,0% ($P < 0,05$). Foi concluído que mórulas de baixa qualidade podem evoluir a blastocistos em um sistema simples de cultivo, sendo que a transferência desses embriões em receptoras resulta em aceitáveis índices de prenhez.

Palavras-chave: bovinos, cultivo *in vitro*, qualidade do embrião, transferência de embriões.

DEVELOPMENTAL ABILITY OF BOVINE BLASTOCYSTS DERIVED FROM *IN VITRO* CULTURE OF LOW-QUALITY MORULAE PRODUCED *IN VIVO*

ABSTRACT: Low quality embryos (Grade 3) represent a considerable proportion of all the embryos produced after collection of superovulated cows. Usually, those embryos are rarely transferred into recipients because the pregnancy rate is low. The aim of this study was to evaluate if blastocysts arising from *in vitro* culture of Grade 3 bovine morulae produced *in vivo* can promote acceptable pregnancy rates when transferred into recipients. Embryos (morulae and blastocysts Grades 1, 2 and 3) were recovered from superovulated *B. taurus* and *B. indicus* donors and transferred immediately into recipient heifers. Grade 3 morulae were cultured in either phosphate buffered saline (PBS added of 10% bovine fetal serum) or in Holding Plus™ media for 24 hours at 38 °C. The resulting blastocysts were morphologically classified (Grades 1, 2 and 3) and transferred into recipients. Pregnancy diagnosis was carried out 60 days after transfer and data were analyzed by logistic regression. Quality of the embryo was the only variable showing significant effect on the

pregnancy rate. Blastocysts-derived from Grade 3 morulae showed a pregnancy rate (45.7%) higher ($P<0.05$) than Grade 3 morulae (17.7%) transferred after collection. Pregnancy rate of Grade 1 and Grade 2 cultured blastocyst was 75.0% and 57.9% respectively, while those classified as Grade 3 was 21.0% ($P<0.05$). It was concluded that low quality morulae can evolve to blastocysts after short-term *in vitro* culture and the transfer of such embryos into recipients can result in acceptable pregnancy rates.

Key words: embryo quality, embryo transfer, *in vitro* culture, bovine.

INTRODUÇÃO

A qualidade do embrião constitui um fator importante que influencia o sucesso de um programa de transferência de embriões. De forma geral, os praticantes da transferência de embriões inferem a qualidade dos embriões considerando critérios morfológicos tais como grau de transparência, homogeneidade e tamanho dos blastômeros, presença de granulação citoplasmática e grau de fragmentação dos blastômeros, entre outros. Baseada em tais critérios morfológicos, a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) elaborou um guia que classifica a qualidade ou “viabilidade” dos embriões em quatro categorias (Grau 1=excelente ou bom; Grau 2=regular; Grau 3=fraco e Grau 4=morto ou degenerado) (ROBERTSON e NELSON, 1998).

Embora seja um método não invasivo, rápido e simples de realizar, a avaliação morfológica constitui um método subjetivo que requer experiência para classificar, com precisão, a qualidade dos embriões. Um estudo conduzido por FARIN *et al.* (1995) mostrou que mesmo utilizando técnicos treinados na avaliação de embriões, a concordância da avaliação foi de 68,5% quando analisaram embriões com vários defeitos morfológicos (Graus 2 e 3). Em outro estudo, Rondeau *et al.* (1995) detectaram anomalias da atividade metabólica em 47% dos embriões considerados de boa qualidade. Mais recentemente, AGUILAR *et al.* (2002) encontraram que aproximadamente 50% dos embriões considerados de boa qualidade no microscópio estereoscópico apresentaram algumas características degenerativas quando analisados sob microscopia eletrônica. No entanto, apesar da subjetividade da avaliação morfológica, existe uma boa relação entre a taxa de prenhez e a classificação prévia do embrião. LINDNER e WRIGHT (1983) obtiveram a maior taxa de prenhez com embriões de qualidade boa e excelente. O problema com os embriões de qualidade regular e fraca é que, aproximadamente, 20 a 30% deles continuam seu desenvolvimento após transferência em receptoras, sen-

do impossível determinar quais são, realmente, os de boa qualidade sem os gastos de uma transferência. Assim, considerando que embriões de baixa qualidade não suportam a congelamento (KENNEDY *et al.* 1983), os mesmos são frequentemente descartados, a menos que existam receptoras excedentes após a transferência dos embriões de boa qualidade.

REICHENBACH (2003) sugeriu que uma forma de aumentar a capacidade de desenvolvimento dos embriões parcialmente degenerados é submetê-los a cultivo antes da transferência. Observações recentes mostraram que meios simples de cultivo, como os utilizados para manter a viabilidade dos embriões após a coleta, podem promover a atividade mitótica e aumentar o número total de células dos embriões de má qualidade quando colocados em cultivo durante 24 horas à temperatura de 38 °C (ROMO *et al.*, 2002; ALVAREZ *et al.*, 2004). Entretanto, não existe informação sobre a capacidade desses embriões “reconstituídos” continuar seu desenvolvimento quando transferidos em receptoras. O objetivo deste estudo foi de avaliar a taxa de prenhez após transferência de blastocistos bovinos derivados do cultivo *in vitro* de mórulas Grau 3 produzidas *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

a) Local e animais

O experimento foi realizado em cinco diferentes fazendas localizadas na região de Garça (Estado de São Paulo, Brasil). Como doadoras foram utilizadas vacas *Bos taurus taurus* (Angus e Limousin) e *Bos taurus indicus* (Guzerá e Nelore), enquanto que novilhas mestiças foram utilizadas como receptoras. Os animais foram mantidos em pastejo e durante a estação seca foram suplementados com ração concentrada visando suprir suas necessidades nutricionais. Sal mineral e água foram disponibilizados *ad libitum*.

b) Produção de embriões

O tratamento de superovulação foi iniciado cinco dias após a colocação de um implante intravaginal contendo progesterona (CIDR-B, InterAg, New Zealand) juntamente com uma injeção im de 2,5mg de benzoato de estradiol (Estrogin, Lab. Farmavet, Brasil). As doadoras receberam 250 (*B. indicus*) ou 400 (*B. taurus*) UI de FSH-LH (Pluset, Lab. Calier, Espanha) aplicadas em doses decrescentes, duas vezes ao dia, durante quatro dias. Na manhã do terceiro dia, foi aplicada uma injeção de 150µg de D(+) cloprostenol (Veteglan, Lab. Calier, Espanha) e na tarde, do mesmo dia, foi retirado o CIDR-B. A inseminação foi realizada 48 e 62 horas após a injeção do Veteglan. Sete dias após a inseminação foi realizada a coleta dos embriões utilizando a via cervical conforme metodologia descrita previamente (SARTORI *et al.*, 2003). A procura e a recuperação dos embriões foi realizada sob o microscópio estereoscópico (aumento de x60). Posteriormente, os embriões foram classificados considerando seu aspecto morfológico, conforme critérios estabelecidos pela IETS (ROBERTSON e NELSON, 1998), descritos a seguir:

Grau 1 (excelente ou bom): estágio de desenvolvimento correspondente ao esperado; massa embrionária simétrica, esférica, com blastômeros individuais que são uniformes em tamanho, cor e densidade; forma regular, a zona pelúcida (ZP) não deve apresentar superfície côncava ou plana, deve ser lisa, preferencialmente intacta; as células separadas da massa celular do embrião não devem ultrapassar 15% do material celular total.

Grau 2 (regular): estágio de desenvolvimento correspondente ao esperado; forma regular, ZP intacta ou não, irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais; células separadas da massa celular do embrião compreendem mais de 15% do material total celular; pelo menos 50% das células compõem uma massa embrionária viável, intacta.

Grau 3 (fraco): estágio de desenvolvimento não corresponde ao esperado; irregularidades maiores na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais; menos de 75% das células degeneradas; pelo menos 25% das células compõem uma massa embrionária viável, intacta.

Grau 4 (morto ou degenerado): estágio de desenvolvimento não corresponde ao esperado, embrião em degeneração; massa embrionária de menos de 25% de todo material presente no interior da ZP; ovócitos ou estruturas unicelulares degeneradas.

Após a classificação, os embriões foram mantidos em meio Holding Plus™ (Bioniche Animal Health, USA) até a realização da transferência, ou colocados em cultivo para continuar seu desenvolvimento.

c) Sincronização das receptoras, cultura e transferência de embriões

A sincronização do cio das receptoras foi realizada aplicando 150µg de D(+) cloprostenol (Veteglan) em novilhas cíclicas 24 horas antes que nas doadoras (durante o processo de superovulação).

Todos os embriões (mórulas e blastocistos) Graus 1 e 2 (n=143) foram transferidos nas receptoras na primeira hora após a coleta, enquanto que as mórulas Grau 3 foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos. Os embriões do grupo 1 (n=35) foram transferidos em receptoras minutos após a coleta, enquanto os do grupo 2 (n=112) foram cultivados em solução salina com tampão fosfato (PBS, Nutricell, Brasil) adicionada de 10% de soro fetal bovino (SFB, Lab. Cultilab, Brasil) ou em meio Holding Plus™ (Bioniche Animal Health, USA) durante 24 horas em estufa a 38 °C. Os blastocistos originados após esse período de cultivo foram morfológicamente classificados (Graus 1, 2 e 3) e transferidos em receptoras. O diagnóstico de prenhez foi realizado por ultra-sonografia 60 dias após a transferência.

d) Análise dos dados

Os dados foram submetidos ao procedimento de regressão logística utilizando o software Statistica 6.0 (STATSOFT, 2002). Na análise, foram consideradas as seguintes variáveis independentes: raça da doadora, estágio e qualidade do embrião, meio de cultivo, grau de sincronia da receptora com a doadora, tamanho do corpo lúteo (CL) da receptora e local de depósito do embrião (corno uterino esquerdo ou direito).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De 290 embriões viáveis recuperados de 56 doadoras, 178 (mórulas e blastocistos) foram transferidos imediatamente após a coleta e 112 mórulas Grau 3 foram colocadas em cultivo e as que evoluíram a blastocisto foram transferidas no dia seguinte. A taxa de prenhez das receptoras que receberam embriões imediatamente após a coleta variou de 17,1% (mórulas Grau 3) a 69,0% (blastocistos Grau 1) (Tabela 1).

Tabela 1. Taxa de prenhez após transferência de embriões (mórulas e blastocistos) de diferentes qualidades imediatamente após a coleta

Estádio do embrião	Grau	n	Prenhez (%)
Blastocisto	1	37	25 (69,0)a
Blastocisto	2	29	12 (41,4)a
Mórula	1	31	18 (58,1)a
Mórula	2	46	25 (54,3)a
Mórula	3	35	6 (17,1)b

Não houve diferença ($P>0,05$) na taxa de prenhez obtida com embriões Grau 1 e 2, enquanto que mórulas Grau 3 produziram significativamente menos prenhez ($P<0,05$). Estádio do embrião, grau de sincronia da receptora com a doadora, tamanho do corpo lúteo da receptora, local de depósito do embrião (corno uterino esquerdo ou direito) e raça da doadora não influenciaram a taxa de prenhez.

A proporção de mórulas Grau 3 que evoluíram a blastocisto no meio Holding Plus™ não foi significativamente diferente ($P>0,05$) da observada no PBS (Tabela 2).

Tabela 2. Taxa de desenvolvimento a blastocisto de mórulas de baixa qualidade (Grau 3) mantidas em cultivo *in vitro* durante 24 horas em meio Holding Plus™ ou PBS + 10% SFB

Meio de cultivo	n	Taxa de blastocisto
Holding Plus™	58	23 (39,6%)a
PBS +10% SFB	54	23 (42,6%)a

Aproximadamente 40% das mórulas Grau 3 colocadas em cultivo evoluíram a blastocistos nos dois meios. Esses resultados confirmam que meios simples de cultivo adicionados de um substrato protéico (albumina ou líquido folicular bovino) podem estimular o crescimento celular (Romo et al. 2002; Alvarez et al., 2004). Dos blastocistos produzidos, 17,4% foram considerados como Grau 1, 41,3% Grau 2 e 41,3% Grau 3. Provavelmente, a qualidade dos blastocistos após cultura foi decorrente do grau das lesões das mórulas Grau 3. Com efeito, analisando a ultra-estrutura de células de mórulas de má qualidade, Abe et al., (2002) observaram núcleos com baixa atividade transcripcional, um grande número de gotas lipídicas citoplasmáticas e mitocôndrias imaturas. Como resultado, algumas das mórulas Grau 3 não foram capazes de continuar seu desenvolvimento em cultivo ou resultaram em blastocistos com algum comprometimento aparente, com poucas chances de originar uma gestação quando transferidos em receptoras.

A transferência dos blastocistos derivados da cultura *in vitro* de mórulas Grau 3 resultou em uma taxa de prenhez de 45,7%. Quando comparado com as mórulas transferidas imediatamente após a coleta, esse valor não difere das mórulas Grau 1 (58,1%), mas foi significativamente superior ($P<0,05$) ao obtido com as mórulas Grau 3 (17,1%). Na Tabela 3, são mostrados os índices de prenhez dos blastocistos cultivados conforme sua qualidade morfológica.

Tabela 3. Taxa de prenhez após transferência de mórulas após a coleta (Graus 1 e 3) e blastocistos cultivados (Graus 1, 2 e 3) derivados de mórulas Grau 3

Estádio do embrião	Grau	n	Prenhez (%)
Mórula	1	31	18 (58,1)a
Mórula	3	35	6 (17,1)b
Blastocisto	1	8	6 (75,0)a
Blastocisto	2	19	11 (57,9)ab
Blastocisto	3	19	4 (21,0)b

Os blastocistos cultivados considerados de boa qualidade (Grau 1) obtiveram uma maior taxa de prenhez que os considerados de má qualidade (Grau 3). Dessa forma, embora subjetiva, a avaliação

morfológica dos embriões cultivados deve ser recomendada antes de realizar a transferência, pois embriões considerados de má qualidade resultam em baixa taxa de prenhez.

CONCLUSÃO

Considerando os resultados do presente trabalho, pode ser concluído que o cultivo *in vitro* durante um curto período (até 24 horas) permite a mudança de estágio celular de embriões de aparente baixa qualidade. A transferência desses embriões em receptoras resulta na obtenção de índices de prenhez semelhantes aos obtidos com embriões de boa qualidade, não cultivados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H. et al. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. **Theriogenology**, Los Altos, v.57, n.4, p.1273-1283, 2002.
- AGUILAR, M.M. et al. Comparison of stereoscopy, light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, n.6, p.341-346, 2002.
- ALVAREZ, R.H. et al. In vitro development of poor quality bovine embryos submitted to three different culture medium. XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32(suppl.), p.42. 2004.
- FARIN, P.W. et al. Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo or in vitro. **Theriogenology**, Los Altos, v.44, n.3, p.339-350, 1995.
- KENNEDY, L.G. et al. The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. **Theriogenology**, Los Altos, v.19, n.6, p.823-832. 1983.
- LINDNER, G.M.; WRIGHT, R.W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, Los Altos, v.20, n.4, p.407-416, 1983.
- REICHENBACH, H.D. Transferência e congelamento de embriões bovinos: considerações práticas. XVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31(supl.), p.15-27, 2003.
- ROBERTSON, I.; NELSON R.E. Certification and identification of the embryo. In: STRINGFELLOW, D.A ; SEIDEL, S.M. (Eds.). **Manual of the International Embryo Transfer Society**. Savoy: IETS, 1998. p.103-134.
- ROMO, S. et al. In vitro culture of in vivo-derived Grade 3 bovine embryos increases development and quality. **Theriogenology**, Los Altos, v.57, p.526, 2002.
- RONDEAU, M. et al. Assessment of embryo potential by visual and metabolic evaluation. **Theriogenology**, Los Altos, v.44, n.3, p.351-366, 1995.
- SARTORI, R. et al. Improvement in recovery of embryos/ ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. **Theriogenology** Los Altos, v.60, n.7, p.1319-1330, 2003.
- STATSOFT Inc. **Statistica for Windows**. Release 6.0. Tulsa: USA, 2002.