

Viabilidade técnica da inovulação de dois embriões por fêmea bovina

¹Luiz Filipe Tavares de Souza^{1*}, João Carlos Beirigo Moreira¹, Michelly Soares Silva¹, Guilherme Guerra Alves²

RESUMO

A produção de bovinos no país vem crescendo exponencialmente e a utilização das biotecnologias da reprodução está se consolidando no meio. Objetivando comprovar a eficiência da inovulação de dois embriões por fêmea bovina, foram utilizados 900 animais para a implantação de um embrião e outros 900 animais para a implantação de dois embriões. As receptoras passaram pelo procedimento de transferência de embrião e foram analisadas entre janeiro de 2020 e outubro de 2023. Essas vacas foram sincronizadas com protocolo de três manejos: no D0, ocorreu a aplicação de benzoato de estradiol e o implante de progesterona; no D8, houve a aplicação de prostaglandina F2 α , gonadotrofina coriônica equina e cipionato de estradiol, além da retirada do implante de progesterona; e, no D17, foi realizada a transferência dos embriões. Após 35 dias das inovulações dos embriões, foi feito o diagnóstico de gestação e, aos 65 dias, esse foi reafirmado. A inovulação de dois embriões por fêmea bovina foi testada para comprovação de sua eficácia e apresentou, nesta pesquisa, um melhor desempenho no aumento da taxa de prenhez quando comparada aos casos que receberam apenas um embrião. Como resultado das inovulações de dois embriões, obteve-se um montante de 428 gestações (47,5%), sendo 295 (69%) gestações normais e 133 (31%) gestações gemelares, com uma taxa de abortos de 2% e de natimortos de 1,56%; enquanto as

¹Discentes da escola de Medicina Veterinária. Centro Universitário Una. Rod. BR-262 s/n, km. 480 (Zona Rural), Bom Despacho, MG – Brasil, (37) 3516-1200. *Autor correspondente: luizfelipe1323@gmail.com

² Professor orientador do Centro Universitário UNA. Rodovia BR-262, km 480,s/n - Zona Rural, Bom Despacho, MG – Brasil 356000-000.

23 inovulações de um único embrião obtiveram 315 gestações (35%), com taxas de aborto de
24 1,5% e de natimortos de 1%. A taxa de gestações gemelares foi de 31%, nascendo 529
25 bezerros provenientes de 428 gestações. Sendo assim, a taxa de natalidade foi de 123,5%,
26 enquanto, na inovulação de um embrião, essa foi de 92,6%, tendo nascido 292 bezerros de
27 315 gestações.

28 **Palavras-chave:** inovulação, aumento de prenhez, gestação gemelar, transferência de
29 embrião.

30

31 INTRODUÇÃO

32 A transferência de embrião (TE) tem crescido exponencialmente no meio comercial da
33 bovinocultura devido a ser uma das biotecnologias que permite difundir uma genética de
34 superioridade em menor tempo comparado à reprodução fisiológica. A TE possibilita que o
35 intervalo entre gerações diminua e que haja o aumento genético de um rebanho. Concretizada
36 em meados do último século, a primeira transferência de embrião em bovinos foi descrita nos
37 Estados Unidos na década de 70 (GONÇALVES et al., 2014). No Brasil, obtiveram-se relatos
38 das primeiras transferências em 1980, ainda no método *in vivo*, vindo a se tornar pioneiro
39 mundialmente reconhecido em suas transferências de embriões uma década após o primeiro
40 relato (SILVA, 2020).

41 Existem duas formas de se produzir o embrião para a transferência. Em uma delas, os
42 embriões são produzidos de maneira fisiológica e retirados ao sétimo dia após inseminação
43 (IA) por meio de lavado uterino, técnica que foi denominada fertilização *in vivo* quando se
44 iniciou o processo de produção. Por volta do ano de 2005, surgiu um método inovador de
45 produção de embriões *in vitro* (PIV), que consiste na aspiração dos ovócitos das vacas
46 doadoras e na realização da fertilização desses no laboratório, sendo inovulados sete dias após
47 a fecundação (ROBERTS et al., 2016). Todas as duas técnicas são eficazes na produção,

48 sendo utilizadas, pelo médico veterinário responsável, a que melhor atende à demanda
49 proposta. Os trabalhos descritos que abrangem essa área da reprodução bovina são poucos,
50 assim, deixando muitas questões em aberto, como a inovulação de dois embriões por fêmea
51 bovina, o aumento de reconhecimento do embrião no meio uterino por meio da produção de
52 interferon-tau (INFT) e a produção de gestações gêmeares para o aumento de indivíduos
53 nascidos (ECHTERNKAMP et al., 2007). Os poucos trabalhos existentes relatam a
54 inviabilidade prática da transferência de dois embriões em um mesmo animal, devido às altas
55 chances de ocorrerem abortos e retenções de placenta (CHEN et al., 2006). Na atualidade,
56 porém, há projetos de produção de gestações gêmeares em bovinos através da transferência
57 de dois embriões por fêmea receptora (FALCOLI et al., 2020).

58 Esta pesquisa tem o objetivo de avaliar a viabilidade do aumento de prenhez e de
59 nascimentos de bezerros(as) por meio da gestação gêmealar produzida pela inovulação de dois
60 embriões por fêmea bovina.

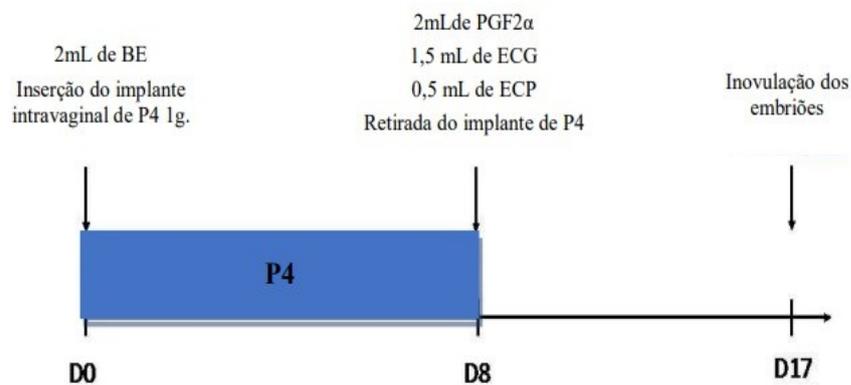
61

62 **MATERIAL E MÉTODOS**

63 No período de janeiro de 2020 a outubro de 2023, foram usadas como amostras 1.800
64 fêmeas bovinas aptas para a transferência de embrião. Dentre elas, 900 receberam a
65 inovulação de apenas um embrião e 900 receberam a inovulação de dois embriões. Esses
66 animais pertencem a três fazendas da região central de Minas Gerais: Fazenda Aroeira,
67 Fazenda Carlos Cruz e Fazenda Lana Drummond. Eram vacas e novilhas mestiças, destinadas
68 a serem receptoras para transferência de embrião, com idades entre 2 e 6 anos de idade e com
69 escore de condição corporal (ECC) de 3, considerando uma escala de 1 a 5.

70 Para a seleção de quais animais poderiam ser protocolados e receber a transferência
71 dos embriões, foi feito o exame ginecológico, o qual avaliou se alguma fêmea possuía
72 problema reprodutivo. Ao final do exame, as vacas se mostraram aptas, assim, iniciando o

73 protocolo hormonal padrão, composto por três manejos realizados nos: dia 0 (D0), dia 8 (D8)
74 e dia 17 (d17). O D0 foi composto pela aplicação de 2mL de benzoato de estradiol (BE, RIC-
75 BE®) e pela colocação do implante intravaginal com 1g de progesterona (P4, Sincrogest®);
76 No D8, foi feita uma aplicação, por via intramuscular, de 2mL de D- cloprostenol, análogo
77 sintético da prostaglandina F2 α (PgF2 α , Sincrocio®), de 0,5mL de cipionato de estradiol
78 (ECP, SincroCP) e de 300UI - 1,5ml - de gonadotrofina coriônica equina (eCG, Novormon®),
79 além da retirada do implante de progesterona; No D17, realizou-se a transferência dos
80 embriões nas receptoras, conforme Figura 1.



81

82

Figura 1: Protocolo hormonal utilizado

83

84 Os embriões foram envazados e enviados, pelo laboratório de genética referente à
85 região de cada fazenda atendida, através de uma transportadora própria para isso, a qual
86 mantém o produto na mesma temperatura corporal dos animais.

87 Antes dos embriões serem inovulados nas receptoras, foi realizado um segundo exame
88 ginecológico, com auxílio da ultrassonografia transretal, em modo B, utilizando um transdutor
89 linear de 5,0 MHz, o qual avalia o útero e o ovário. As receptoras que apresentavam um ou
90 mais corpo(s) lúteo(s) (CL) em um ou nos dois ovários receberam a inovulação dos embriões,
91 já as receptoras que não tinham a presença de CL foram descartadas.

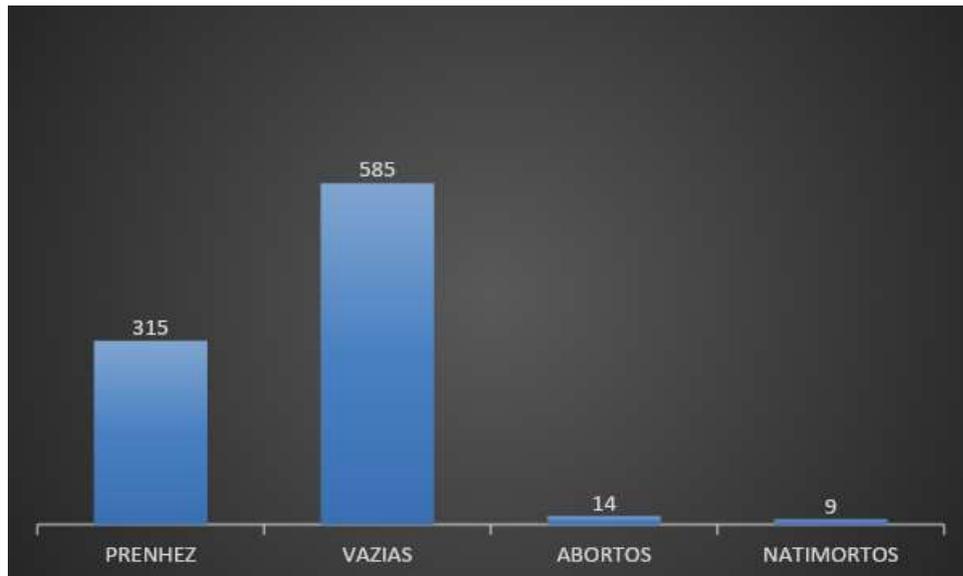
92 Durante o processo de inovulação, no momento da transferência, cada receptora foi
93 anestesiada por via epidural baixa com 3ml de cloridrato de lidocaína 2%. Foi feita, também,
94 a higienização da vulva com água e papel toalha. O inovulador, instrumento utilizado para
95 transferir, juntamente com a bainha e a palheta contendo o(s) embrião/embriões, foram
96 protegidos com a camisa sanitária para evitar contaminação. Os embriões foram depositados
97 no terço médio/final do corno uterino que apresentou o ovário com CL. Assim, foram
98 inovulados apenas um embrião por palheta em 900 animais e dois embriões contidos em uma
99 mesma palheta nos outros 900 animais.

100 No período de 35 dias após cada lote de animais terem sido inovulados, retornou-se às
101 fazendas para que fosse feito o diagnóstico de gestação (DG). Nesse, foi anotado quais e
102 quantos animais estavam com gestação positiva de um ou dois embriões e quais não ficaram
103 gestantes. Após 30 dias do primeiro diagnóstico, foi realizada a sexagem fetal dos animais
104 que deram gestação positiva, tanto de um quanto de dois embriões no primeiro diagnóstico.
105 No decorrer da gestação dos animais, houve o acompanhamento dos dados que eram obtidos
106 por colaboradores das fazendas, tais como: se havia a presença de abortos, nascimentos e
107 fetos natimortos.

108

109 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

110 Dentre todos os 900 animais que receberam apenas um embrião, obtivemos os
111 resultados evidenciados na Figura 2.



112

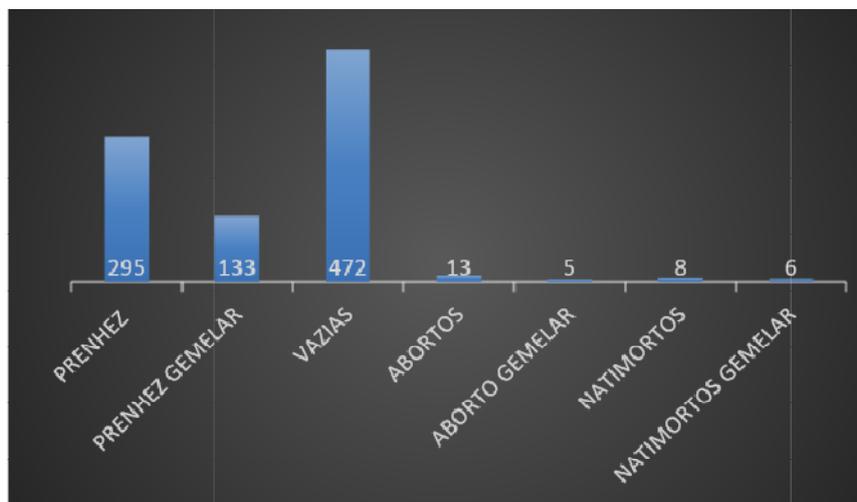
113

Figura 2: Gráfico de resultados da inovação de um embrião.

114

115 Dentre os animais que foram inovadas com apenas um embrião, obtivemos 315
 116 animais com gestação confirmada e 585 animais que não estavam gestantes no DG, aos 35
 117 dias após a inovação. Acompanhamos a gestação dos 315 animais até o nascimento dos(as)
 118 bezerros(as). Durante os meses adjacentes, ocorreu um total de 14 abortos e 9 bezerros(as)
 119 natimortos. O restante dos animais teve partos normais e saudáveis.

120 Quanto aos 900 animais que receberam embriões duplos, apresentou-se o resultado
 121 evidenciado na Figura 3.



122

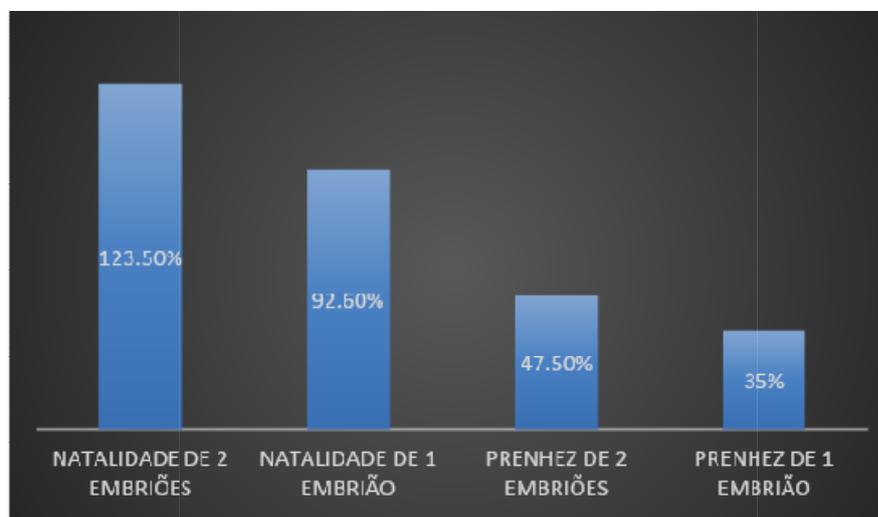
123

Figura 3: Gráfico de resultados da inovação de dois embriões.

124

125 O resultado dos 900 animais que receberam embriões duplos na transferência foi de:
126 295 animais com gestação de um bezerro(a), 133 animais com gestação gemelar - de dois
127 bezerros(as) - e 472 animais que não ficaram gestantes no DG aos 35 dias após a
128 transferência. Também foi feito o acompanhamento até o parto de todos os animais do
129 experimento. No decorrer dos meses, constatou-se um total de 13 abortos provenientes das
130 vacas que ficaram gestantes de apenas um bezerro(a), 5 abortos provenientes das vacas que
131 estavam com gestação gemelar, 8 bezerros natimortos de vacas gestantes de um bezerro(a) e 6
132 bezerros natimortos de vacas com gestação gemelar. O restante dos animais teve partos
133 normais e saudáveis.

134 Ainda foi realizado um comparativo entre as taxas de natalidade e prenhez das vacas
135 que receberam a transferência de um embrião e das vacas que receberam a transferência de
136 dois embriões, conforme a Figura 4.



137

138 Figura 4: Gráfico comparativo de taxas de prenhez e natalidade.

139

140 O gráfico informa uma taxa de natalidade de 123,5% e uma taxa de prenhez de 47,5%
141 nos animais que foram inovuladas com dois embriões; e 92,6% de natalidade e 35% de
142 prenhez nos animais que receberam apenas um embrião. Atualmente, a transferência de

143 embriões tem ganhado grande destaque no meio da reprodução bovina, apesar de ainda haver
144 muitas inconsistências que interferem no resultado final, como o tempo de cultivo do
145 embrião, a fase de desenvolvimento, o lado em que está o corpo lúteo e o tempo gasto para
146 implantação. Sabe-se que o embrião e o endométrio secretam vesículas extracelulares que
147 fazem a comunicação entre ambos, assim, obtendo o contato entre o concepto que está se
148 desenvolvendo e o meio uterino da gestante, isso é muito importante para que suceda a
149 implantação do embrião. Inovulando dois embriões, haverá um aumento na produção dessas
150 vesículas extracelulares (interferon-tau), o que vai elevar o reconhecimento materno,
151 juntamente com a receptividade do útero, provendo, assim, uma excelente chance de o
152 embrião ter sua implantação na parede uterina bem-sucedida por volta de 8-9 dias após a
153 fecundação (SAADELDIN et al., 2015).

154 Após a inovulação, entre 1-2 dias, ocorre a eclosão do blastocisto. Assim, o concepto
155 se alonga devagar por aproximadamente 15 dias, chegando a um tamanho de cerca de 10 a
156 15cm que ocupa quase todo o corno uterino ipsilateral e o ovário com presença de CL
157 (DORNIK et al., 2013). Com a presença do(s) concepto(s) alongado(s) no meio uterino, há
158 uma maior área de contato entre a parede uterina da mãe e o(s) próprio(s) concepto(s)
159 (FORDE e LONERGAN, 2017). Esse alongamento é importante pois ele potencializa a
160 produção do interferon-tau, o que sinaliza a gestação para o organismo da mãe e inibe, no
161 endométrio do útero, a expressão de estrógeno e ocitocina. Assim, previne-se a liberação de
162 PGF 2α , que é luteólítica (SPENCER et al., 2013), além de aumentar a área de vascularização
163 entre a mãe e o concepto (BLOMBERG et al., 2008).

164 Com a inovulação de dois embriões, há um aumento relativo de 12,5% a mais de
165 prenhez em contraste com as inovulações de um embrião. Ademais, há uma probabilidade em
166 torno de 31% das gestações prosseguirem gemelares, o que traz um benefício de aumento da

167 natalidade em 30,9% comparado às inovulações de apenas um embrião. Assim, obtêm-se
168 mais produtos (bezerros) em um único trabalho (CAPOVILLA et al., 2000).

169 Os abortos e natimortos das inovulações de dois embriões, comparados aos de um
170 embrião, foram insignificantes nesta pesquisa, com 2% de aborto e 1,56% de natimortos nos
171 animais que tiveram inovulação de dois embriões e 1,5% de aborto e 1% de natimortos nos
172 animais que tiveram inovulação de um embrião.

173 O interesse econômico na fertilização de dois embriões ocasionando partos gemelares
174 é complexo, haja vista que a gemelaridade em bovinos está diretamente ligada a uma diversa
175 série de fatores prejudiciais (QUARESMA et al., 2004), como o aumento nos casos de
176 retenção de placenta, partos distócicos, aumento da mortalidade, natimortos, abortos e atraso
177 no reinício da atividade ovariana das vacas pós-parto, fatores importantes para a eficiência
178 reprodutiva (KIRKPATRICK, 2001).

179

180 **CONCLUSÃO**

181 Assim, nesta pesquisa e metodologia, obtivemos resultados da viabilidade da
182 inovulação de dois embriões por fêmea bovina. O procedimento se mostrou viável pelo
183 aumento favorável tanto da taxa de prenhez quanto da taxa de natalidade de bezerros em
184 gestações normais e em gestações gemelares, se comparado a inovulações únicas por fêmea
185 bovina.

186

187 **AGRADECIMENTOS**

188 Esta pesquisa contou com a contribuição do médico veterinário Fernando Ordones
189 Lemos e com dados cedidos pelas fazendas Aroeira, Carlos Cruz e Lanna Drumond.

190

191 **DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE**

192 Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

193 **REFERÊNCIAS**

194 BLOMBERG L. et al. Blastocyst elongation, trophoblastic differentiation, and embryonic
195 pattern formation. *Reproduction* 2008; 135:181–195.

196 CAPOVILLA, L. C. T. et al. Technology and economic viability of twin pregnancy
197 production in nelore breed by embryo transfer. *Archives of Veterinary Science* v.5, p. 117-
198 127, 2000.

199 CHEN, Y. et al. Effect of interferon-tau administration on endometrium of nonpregnant ewes:
200 a comparison with pregnant ewes. *Endocrinology*, v. 147, n. 5, p. 2127-2137, 2006.

201 DORNIK, P. et al. Physiology and Endocrinology Symposium: biological role of interferon-
202 tau in endometrial function and conceptus elongation. *Journal of animal science*, v. 91, n. 4, p.
203 1627-1638, 2013. ISSN 1525-3163.

204 ECHTERNKAMP SE et al. (2007) Increased calf production in
205 cattle selected for twin ovulations. *Journal of Animal Science* 85, 3239–3248.
206 doi:10.2527/jas.2007-0210.

207 FALCOLI, F. L. et al. A rare case of heteropaternal twin calves after natural mating in Brazil.
208 *Animal Reproduction*, v. 17, n. 4, 2020. doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0217.

209 FORDE N, LONERGAN P. Interferon-tau and fertility in ruminants. *Reproduction* 2017;
210 154:F33–F43.

211 GONÇALVES, P. B. D. et al. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal - 2a Edição*. Roca,
212 2014.

213 KIRKPATRICK, B.W. Management of twinning cow herds. *Journal of Animal Science*, v.80,
214 p.14-18, 2001.

215 QUARESMA M. A. et al. Twinning induction and its effect on embryo-foetal calf survival,
216 and on reproductive efficiency of Mertolengocattle kept at pasture. RPCV, v.99, n.550, p.109-115,
217 2004.

218 ROBERTS R.M. et al. 2016 The evolution of the placenta. *Reproduction* 152 R179–R189.
219 (doi:10.1530/REP-16-0325)

220 SAADELDIN, I. M. et al. Embryonic–maternal cross-talk via exosomes: potential
221 implications. *Stem Cells and Cloning : Advances and Applications*, v. 8, p. 103- 107, 07/07
222 2015. ISSN 1178-6957.

223 SPENCER, T. E. et al. Conceptus-derived prostaglandins regulate gene expression in the
224 endometrium prior to pregnancy recognition in ruminants. *Reproduction*, v. 146, n. 4, p. 377-
225 387, October 1, 2013 2013.

226 SILVA, E. I. C. Reprodução animal: transferência de embriões em animais, e a indústria de
227 embriões no Brasil. 2020B.

228 SOUZA, L. F. T. et al. Inovação de dois embriões por receptora bovina – relato de caso. X
229 Colóquio Técnico Científico de Saúde Única, Ciências Agrárias e Meio Ambiente. 2022.

230

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luiz Filipe Tavares de Souza

231

João Carlos Beirigo Moreira

232

Michelly Soares Silva

233

234 Trabalho de Conclusão de Curso submetido à banca examinadora como requisito parcial para
235 obtenção do grau de Médico(a) Veterinário(a), no Centro Universitário UNA Bom Despacho.

236

237 Aprovado em XX de dezembro de 2023, pela banca examinadora constituída pelos membros:

238

239

Prof. Guilherme Guerra Alves

240

Presidente – Orientador

241

242

Prof. Gabriel Almeida Dutra

243

Examinador(a)

244

245

246

Prof. Patrícia Alves Dutra

247

Examinador(a)