

Classificação de embriões bovinos produzidos *in vivo*

João Henrique Moreira Viana¹

Introdução

Os procedimentos de indução de ovulações múltiplas (superovulação), coleta e transferência de embriões tem sido largamente utilizadas como biotécnicas reprodutivas em bovinos. Durante o processo, os embriões são recuperados do útero das doadoras, identificados e classificados. Esta classificação é realizada em função do estágio de desenvolvimento e da qualidade morfológica, e a avaliação final da eficiência do processo superovulatório e a definição do destino dos embriões (transferência direta, congelamento ou descarte) devem levar em consideração estes dois parâmetros.

Na avaliação do estágio, são consideradas características associadas à progressão do desenvolvimento embrionário, como número, tamanho e grau de compactação dos blastômeros (células embrionárias), formação da blastocèle (cavidade embrionária), espaço ocupado pelo embrião e espessura

da zona pelúcida (envoltório externo). Para cada dia após a ovulação, é esperado um determinado estágio de desenvolvimento. Em bovinos, os embriões chegam ao útero em torno do 5º dia após a ovulação, e eclodem em torno do 8º dia, de forma que a coleta de embriões pela técnica não cirúrgica de lavagem (flushing) uterina deve ser realizada entre o 6º e o 7º dias. Como as ovulações em bovinos superovulados ocorrem em um intervalo relativamente curto (75% nas primeiras 4h após o início das ovulações), pode ocorrer uma pequena variação no estágio entre embriões da mesma coleta. Embriões em estágio de desenvolvimento incompatível com o momento da coleta (6º – 7º dias), ou ocorrência de discrepâncias significativas entre embriões recuperados em um mesmo lavado sugerem retardo ou bloqueio no desenvolvimento embrionário e consequente comprometimento do potencial de desenvolvimento pós-transferência.

A classificação morfológica de qualidade considera a presença e a magnitude de imperfeições como

¹João Henrique Moreira Viana - Médico-Veterinário, D.Sc. – Pesquisador da Embrapa Gado de Leite
jhmviana@cnpq.embrapa.br

presença de blastômeros de tamanhos irregulares, em extrusão (separação da massa celular), apresentando vacuolização, morte ou fragmentação, alterações de cor ou tamanho da massa celular, ausência de compactação e danos na zona pelúcida. A avaliação dos embriões é feita em função do percentual da massa celular comprometida pelas alterações. A sobrevivência embrionária pós-transferência, principalmente no período do reconhecimento materno da gestação, requer um número mínimo de blastômeros viáveis, conseqüentemente quanto maior o comprometimento da massa celular por defeitos morfológicos menor a chance de estabelecimento de gestação. No caso da criopreservação, em que a própria técnica causa danos e eventualmente morte de parte das células embrionárias, embriões de classificação morfológica regular ou pobre tem uma chance mínima de desenvolverem após a transferência.

A Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) normatizou os critérios para classificação morfológica de embriões bovinos produzidos *in vivo* quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade (IETS, 1998). A classificação do estágio de desenvolvimento da IETS usa códigos numéricos que vão de 1 (ócito não fecundado) até 9 (blastocisto eclodido e expandido). A classificação da qualidade dos embriões usa códigos que vão de 1 (embriões de qualidade excelente ou boa) até 4 (embriões mortos ou degenerados). Os quadros a seguir foram compilados de forma a auxiliar os profissionais na realização desta classificação, oferecendo uma referência de acesso rápido, comparativa e comentada, e ainda trazendo alguns exemplos de dúvidas mais comuns.

A utilização dos critérios descritos pode auxiliar na redução da subjetividade da classificação dos embriões recuperados após a superovulação, mas a acurácia e a consistência dependem da experiência do técnico. É recomendável, principalmente para quem está iniciando na atividade, procurar utilizar óptica (lupa ou estereomicroscópio) de qualidade, e que forneça um aumento mínimo de 40x, assim como realizar a classificação após a remoção do embrião do meio de coleta, no qual podem estar presentes muco e debris celulares, e procurar observar o embrião em diferentes ângulos.

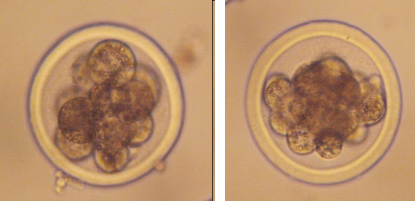
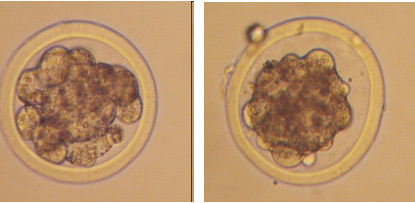
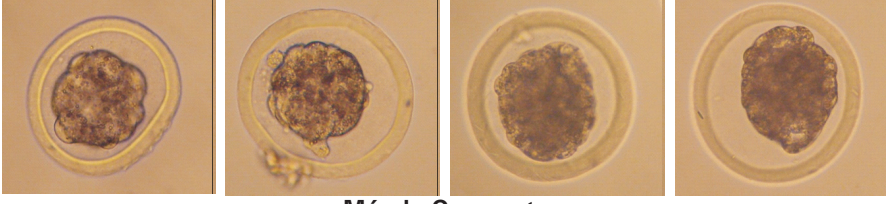
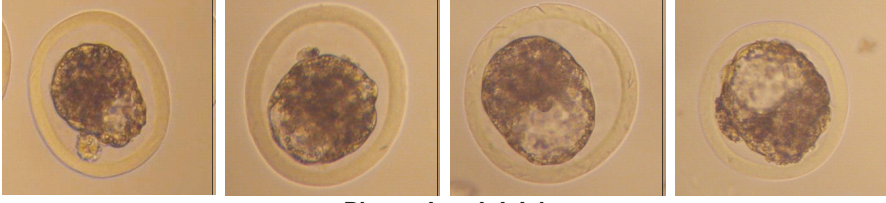
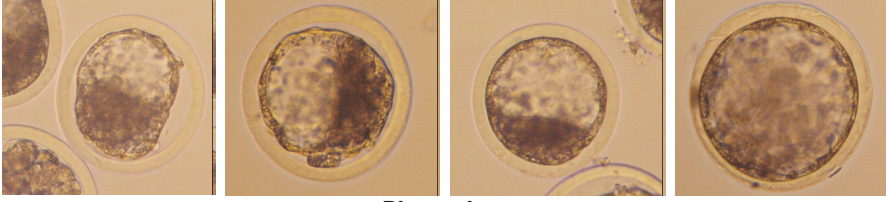
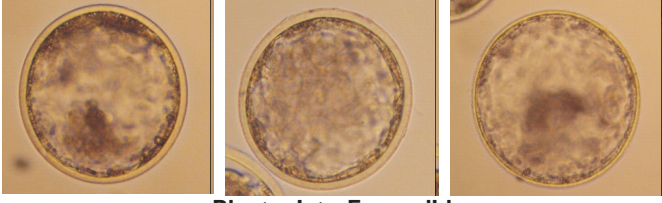
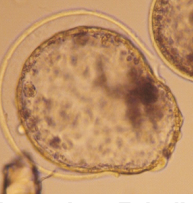
É importante lembrar também que a classificação morfológica é apenas indicativa do potencial de desenvolvimento dos embriões. Alterações funcionais que podem comprometer o desenvolvimento embrionário não são necessariamente refletidas imediatamente na morfologia, ou seja, um embrião aparentemente perfeito pode ter um baixo potencial de desenvolvimento em função de fatores intrínsecos como, por exemplo, defeitos genéticos, ou extrínsecos, como contaminações ou fontes de estresse no dia da coleta. Neste sentido, avaliações dinâmicas, em que se observa a progressão dos estádios de desenvolvimento após um período de cultivo, ou técnicas auxiliares de avaliação, como coloração para contagem de blastômeros e identificação de células apoptóticas, podem auxiliar na determinação do potencial real dos embriões. Estas avaliações, contudo, nem sempre são compatíveis com a dinâmica ou os objetivos da prática comercial da atividade.

Por outro lado, a taxa de gestação após a transferência de embriões é determinada não apenas pela qualidade embrionária, mas também pelos critérios utilizados na manipulação das estruturas, da habilidade do técnico responsável pela transferência, pelo grau de sincronia entre o estágio de desenvolvimento embrionário e a fase do ciclo das receptoras, e pela condição sanitária e nutricional das mesmas. O registro criterioso da classificação dos embriões transferidos, e também de parâmetros como qualidade do corpo lúteo, escore corporal da receptora, dificuldade na execução do procedimento, etc., são de grande valia no momento de interpretar os resultados da TE.

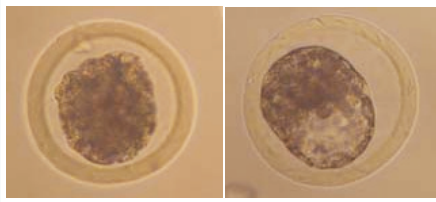
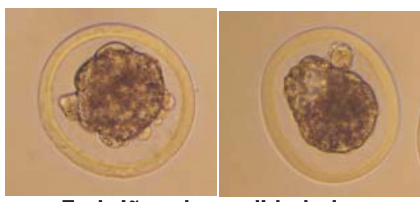
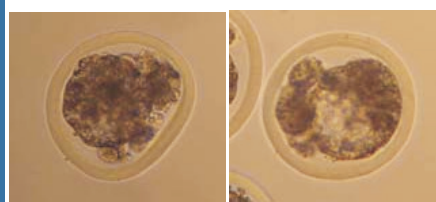
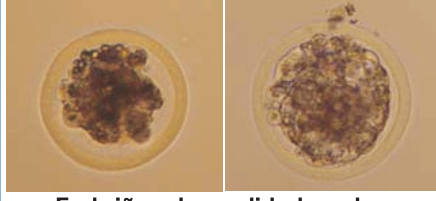
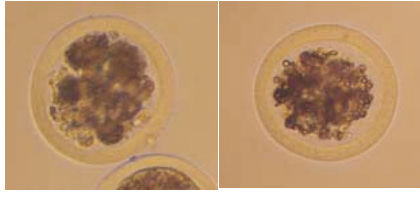
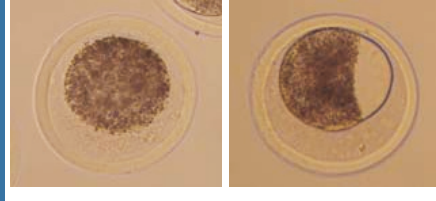
Referências

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. **IETS**, p. 112-113, Illinois, 1998

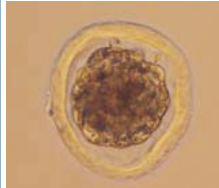
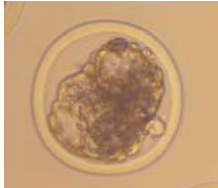
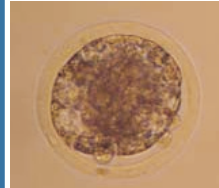
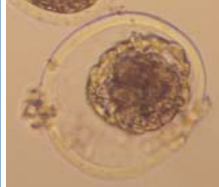
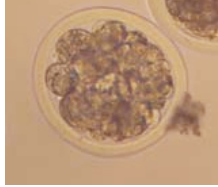
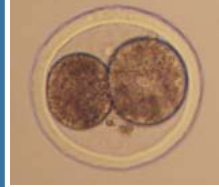
Classificação de embriões bovinos produzidos *in vivo* de acordo com o estágio de desenvolvimento

 <p>8 – 12 Células Código IETS: 2</p>	 <p>Mórula Código IETS: 3</p>	<p>Mórula Fase esperada: dias 5,5-6,0 do ciclo Características: Blastômeros ainda evidentes, porém não é mais possível determinar número exato. Massa de células ocupa maior parte do espaço dentro da zona pelúcida. Período caracterizado pelo fim da fase de celularização e da transição materno zigótica e início do processo de compactação.</p>
 <p>Mórula Compacta Código IETS: 4</p>		<p>Mórula Compacta Fase esperada: dias 6,0 a 6,5 do ciclo Características: Compactação torna a massa de células coesa, dificultando individualização dos blastômeros, e causa retração do embrião em relação à zona pelúcida, com aumento do espaço perivitelínico. Formação de junções de adesão e de oclusão entre as células, preparando o embrião para a formação da blastocel.</p>
 <p>Blastocisto Inicial Código IETS: 5</p>		<p>Blastocisto Inicial Fase esperada: dias 6,5 a 7,0 do ciclo Características: Blastômeros criam gradiente osmótico que atrai água para o espaço intercelular, iniciando a formação de uma cavidade denominada blastocel. Perda da totipotência, com a formação de duas populações celulares distintas: o trofoblasto, que reveste a blastocel, e a massa celular interna (MCI), lateral à blastocel.</p>
 <p>Blastocisto Código IETS: 6</p>		<p>Blastocisto Fase esperada: dias 7,0 a 7,5 do ciclo Características: Blastocel aumenta de tamanho, tornando-se proporcionalmente maior que a massa celular interna e ocupando gradualmente todo o espaço perivitelínico. Trofoblasto sofre diferenciações morfológicas e funcionais associadas à captação de nutrientes, enquanto as células da MCI mantêm potencialidade.</p>
 <p>Blastocisto Expandido Código IETS:</p>	 <p>Blastocisto Eclodido Código IETS: 8</p>	<p>Blastocisto Expandido Fase esperada: dias 7,5 a 8,0 do ciclo Características: Expansão da blastocel causa aumento de tamanho do embrião e progressiva redução na espessura da zona pelúcida (ZP). Maior desenvolvimento do trofoblasto, a MCI é visível dependendo da posição do embrião. Rompimento da ZP caracteriza a eclosão, com o embrião entrando em contato direto com os tecidos maternos.</p>

Classificação de embriões bovinos produzidos *in vivo* de acordo com a qualidade morfológica

 <p>Embriões de qualidade excelente Código IETS: 1</p>	 <p>Embriões de qualidade boa Código IETS: 1</p>	 <p>Embriões de qualidade regular Código IETS: 2</p>
<p>Comentários: Embriões sem defeitos morfológicos ou extrusões celulares, e estágio de desenvolvimento compatível com período pós-ovulação. Máximo potencial de desenvolvimento a fresco ou criopreservado.</p>	<p>Comentários: Embriões com uma ou poucas células de extrusão ou discretas alterações de coloração. Potencial de desenvolvimento semelhante ao embrião grau I, podendo também ser criopreservado.</p>	<p>Comentários: Embriões com maior número de alterações morfológicas ou extrusões celulares, mas com pelo menos 50% da massa celular íntegra e mostrando sinais de desenvolvimento.</p>
 <p>Embriões de qualidade pobre Código IETS: 3</p>	 <p>Embriões degenerados Código IETS: 4</p>	 <p>Oócitos não fecundados</p>
<p>Comentários: Extrusões ou fragmentação comprometendo mais que 50% da massa celular, e dificultando a classificação das células viáveis. Potencial de desenvolvimento significativamente reduzido.</p>	<p>Comentários: Embriões com comprometimento definitivo da massa celular, com blastômeros de tamanhos variados apresentando sinais de degeneração celular, picnose, fragmentação e alterações de cor.</p>	<p>Comentários: Oócito sem sinais de clivagem, apresentando graus variados de retração, pulverização ou sedimentação do citoplasma. No menor aumento podem ser confundidos com mórula compacta ou Bi.</p>

Morfologias que geram dúvidas de interpretação

 <p>Zona Pelúcida irregular Comentário: Achado ocasional e sem relevância funcional, desde que não haja rompimento. Pode ser característica da própria estrutura ou decorrente de danos na manipulação.</p>	 <p>Blastocisto inicial com 2 cavidades Comentário: Achado ocasional. Na maioria das vezes as cavidades confluem para formar uma única blastocèle.</p>	 <p>Blastocèle e MCI sobrepostas Comentário: Embrião com a MCI virada para baixo. Movimentando-se o embrião na placa a distinção da blastocèle e MCI fica evidente.</p>
 <p>Blastocisto com retração Comentário: A retração e re-expansão da blastocèle são normais próximo ao momento da eclosão. Observar a espessura da ZP.</p>	 <p>Falha de compactação Comentário: A compactação é um processo imprescindível para o desenvolvimento da blastocèle, e a não ocorrência ou atraso é sinal de degeneração.</p>	 <p>Degenerado ou não fecundado? Comentário: Embriões não fecundados podem sofrer ativação espontânea. Desta forma, a clivagem inicial não é garantia de fecundação.</p>

Comunicado Técnico, 59

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Gado de Leite
 Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco – 36038-330 Juiz de Fora/MG
 Fone: (32) 3311-7400
 Fax: (32) 3311-7401
 E-mail: sac@cnppl.embrapa.br

1ª edição
 1ª impressão (2009): 150 exemplares

Comitê de publicações

Presidente: *Rui da Silva Verneque*
 Secretária-Executiva: *Inês Maria Rodrigues*
 Membros: *Alexandre Magno Brighenti dos Santos, Alzira Vasconcelos Carneiro, Carla Christine Lange, Carlos Renato Tavares de Castro, Francisco José da Silva Lédo, Juliana de Almeida Leite, Luiz Sérgio de Almeida Camargo, Marcelo Dias Muller, Marcelo Henrique Otênio, Marcos Cicarinni Hott, Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto, Marlice Teixeira Ribeiro, Sérgio Rustichelli Teixeira, Wadson Sebastião Duarte da Rocha*

Expediente

Supervisão editorial: *João Henrique Moreira Viana*
 Tratamento das ilustrações e editoração eletrônica: *Carlos Alberto Medeiros de Moura*