

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DA  
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM  
COELHAS (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*)

AUREA WISCHRAL  
Médico Veterinário  
Bolsista da FAPESP

ANTONIO MATERA  
Professor Titular  
Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia da USP

OZIEL BIZUTTI  
Professor Titular  
Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia da USP

JOSE ANTONIO VISINTIN  
Professor Assistente Doutor  
Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia da USP

WISCHRAL, A.; MATERA, A.; BIZUTTI, O.;  
VISINTIN, J.A. Contribuição para o  
estudo da transferência de embriões  
em coelhas (*Oryctolagus cuniculus*)  
Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S.  
Paulo, 26(1):121-128, 1989.

**RESUMO:** Foram utilizados 2 grupos de  
doadoras superovuladas com 150 UI de  
PMSG por via intramuscular e, 72 horas  
após, acasaladas e submetidas à aplica-  
ção de 100 UI de HCG por via intravenosa  
ou apenas acasaladas. Os 2 grupos de  
receptoras foram sincronizadas com 100  
UI de HCG ou acasaladas com macho vascu-  
tomizado. A transferência dos embriões  
aparentemente viáveis, realizada através  
da cerviz ou punção uterina, revelou,  
após 15 dias,  $10,06 \pm 4,90$  e  $8,83 \pm 0,98$   
ovulações e 40,0% e 66,6% de prenhez  
para os grupos de fêmeas receptoras.  
Entre as fêmeas doadoras foram observa-  
das  $33,75 \pm 21,36$  e  $9,84 \pm 10,41$  ovula-  
ções e índice de recuperação de em-  
briões de 88,39 e 60,94%. Não foram  
observadas diferenças estatisticamente  
significativas entre as vias de  
transferência.

**UNITERMOS:** Reprodução, coelhos; Fertilidade;  
Ovulação; Embriões,  
transferência; Gonadotrofina  
coriônica humana; Soro de  
égua prenhe

INTRODUÇÃO E LITERATURA

Após a divulgação do primeiro tra-  
balho sobre transferência de embriões  
realizado por HEAPE, 9 (1891), a espécie  
leporina tornou-se objeto de pesquisas  
básicas devido a sua fácil adaptação às  
condições de laboratório e possibilidade  
de controle da atividade reprodutiva em  
regime de cobertura ou inseminação arti-  
ficial.

Em 1932, GREGORY, 8 determinou que,  
em condições normais, a coelha ovula em  
função do seu peso, na razão de uma  
ovulação para cada 381 gramas de peso.

A superovulação pode ser obtida  
pelo estímulo hormonal, conforme os  
trabalhos de EL-BANNA & SACHER, 5  
(1976); ROTTMANN & STRANZINGER, 15  
(1977); ROJAS O. et alii, 14 (1978);  
TSUTSUMI et alii, 19 (1979); KILIÇOGLU &  
TEKELI, 13 (1981) que utilizaram PMSG  
associado com LH ou HCG. FUJIMOTO et  
alii, 6 (1974) compararam o acasalamento  
com o estímulo hormonal (HCG) para indu-  
zir a ovulação obtendo, respectivamente,  
4,2 e 4,8 ovulações em média. HULOT &  
POUJARDIEU, 12 (1976) compararam os  
efeitos do acasalamento com macho vascu-  
tomizado, estímulo mecânico da cerviz e  
injeções de LH obtendo, respectivamente,  
11,21; 9,75 e 12,52 corpos lúteos.

ADAMS, 1 (1982) cita a ocorrência  
de folículos luteinizados e hemorrágicos  
em animais que receberam PMSG e HODGSON  
& TALO, 10 (1978) afirmam que a proges-  
terona pode acelerar a migração dos  
embriões, atuando na contração tubárica.

O tempo para a realização da co-  
lheita depende do estágio do embrião  
desejado. Assim, TSUTSUMI & OGURI, 18  
(1972) colheram maioria de mórulas, 60  
horas após o coito e TSUNODA et alii, 17  
(1978) encontraram, 72 horas após a  
indução da ovulação, 74% dos embriões no  
útero, dos quais, 87,09% estavam no  
estágio de mórula. Já SUGIE et alii, 16  
(1982) afirmaram que o período de 72  
horas após a ovulação é característico  
de blastocistos.

Quanto à perda embrionária, ADAMS,  
3 (1960) observou que a maioria (66%)  
ocorreu entre 8 e 17 dias de gestação,  
sendo que a placenta permanece até o  
período do parto.

A técnica de transferência de em-  
briões por via vaginal foi usada por  
DAUZIER, 4 (1962) com 46,6% de eficiên-  
cia, enquanto que a deposição no útero,  
através de perfuração da parede do cor-  
no, foi realizada por ADAMS, 2 (1962)  
com 77,3 a 82,2% de implantações.

Com base nestes dados, os objetivos  
deste trabalho foram observar os efeitos  
do PMSG e HCG sobre a superovulação de  
doadoras e sincronização de receptoras,  
além de estudar duas vias de  
transferência de embriões, cujo resulta-

do é verificado pela comparação do número de fetos viáveis com o número de embriões transferidos.

## MATERIAL E METODO

Foram utilizadas 50 coelhas e 4 machos da raça Nova Zelândia Branca, com peso médio de 3,5 kg e idade entre 6 e 8 meses, mantidos em biotério no Departamento de Cirurgia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em gaiolas isoladas com livre acesso a água e comida, à temperatura ambiente e recebendo 14 horas de luz em cada período de 24 horas.

Três machos foram usados como reprodutores, após espermiograma e o outro sofreu vasectomia, segundo a técnica de HOLTZ & FODTE, 11 (1974). As doadoras receberam 150 UI de PMSG\* intramuscular independente da fase do ciclo estral e, 72 horas após, foram divididas em dois grupos e submetidas ao seguinte tratamento: Grupo I - 13 animais foram acasalados com reprodutores por 2 ou 3 vezes e receberam, em seguida, 100 UI de HCG\*\* por via endovenosa; Grupo II - 13 fêmeas foram acasaladas com reprodutores, 2 a 3 vezes. Três fêmeas foram excluídas do trabalho por não terem aceitado o acasalamento.

Todas as doadoras foram sacrificadas, 72 horas após o acasalamento, para colheita dos embriões por meio de lavagem do aparelho genital e análise dos ovários. Foi estabelecido que os animais que apresentassem mais de 12 ovulações seriam considerados superovulados.

O meio utilizado para lavagem foi o de EAGLE modificado\*\*\*, acrescido de soro fetal bovino a 2%, aquecido a 37° C e colhido em vidro relógio. Após a localização e análise sob lupa com aumento de 10 a 40 vezes, os embriões considerados viáveis foram transferidos para outro vidro relógio contendo o mesmo meio, acrescido de soro fetal bovino a 20% e aquecido a 37° C e, em seguida, aspirados para tubos de microhematócrito utilizados para a transferência de 5 embriões para cada corno uterino.

As receptoras foram divididas em 2 grupos: Grupo III - 15 fêmeas receberam 100 UI de HCG por via endovenosa, Grupo IV - 6 fêmeas foram acasaladas com macho vasectomizado. Tanto a injeção quanto o acasalamento foram realizados simultaneamente ao acasalamento da respectiva doadora.

Para o ato cirúrgico, as receptoras

foram anestesiadas com cloridrato de ketamina\*\*\*\* e cloridrato de xilazina\*\*\*\*\* conforme a técnica descrita por GREEN et alii, 7 (1981), complementada com éter anestésico\*\*\*\*\*. Foram utilizadas duas vias de transferência: 1. perfuração da parede vaginal com agulha calibre 40 x 20 e introdução do tubo de microhematócrito através da cerviz com deposição dos embriões no terço médio do corno uterino direito; 2. perfuração da parede uterina próxima à junção útero-tubárica e penetração do tubo de microhematócrito até o terço médio do corno uterino esquerdo e deposição dos embriões. Após 15 dias da transferência, as receptoras foram sacrificadas e necropsiadas para verificação do número de fetos viáveis e placentas sem fetos.

Na análise estatística foram utilizados os testes "t" de STUDENT e "QUI" Quadrado para alfa igual a 0,05.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes aos animais dos Grupos I, II, III e IV estão apresentados, respectivamente nas Tab. 1, 2, 3 e 4.

Baseados no estudo de GREGORY, 8 (1932), estabelecemos que a ocorrência de  $9,2 \pm 1,2$  ovulações seria considerada normal e, a partir de 12 ovulações, o animal seria considerado superovulado. Foram consideradas da mesma maneira as fêmeas que apresentaram ovários repletos de folículos sem ovulações.

Os resultados mostraram que o PMSG atuou de maneira semelhante nos Grupos I e II, porém, o número maior de ovulações no Grupo I mostrou-se estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), o que sugere o efeito do HCG proporcionando um estímulo adicional a 2 ou 3 cópulas, necessário para ovular o número excedente de folículos.

A média de ovulações obtidas na superovulação mostrou-se superior aos resultados de ROTTMANN & STRANZINGER, 15 (1977) e KILIÇOGLU & TEKELI, 13 (1981), próximos dos encontrados por EL-BANNA & SACHER, 5 (1976) e inferiores aos de TSUTSUMI et alii, 19 (1979), sendo que todos os autores utilizaram diferentes dosagens hormonais. Apenas os animais do Grupo II apresentaram ovários repletos de folículos que não ovularam. A ocorrência de folículos hemorrágicos e císticos já havia sido notada por ADAMS, 1 (1982) o que permite supor que alguns animais deste trabalho apresentaram esta ocorrência devido ao efeito do PMSG.

\* MATORON - 1.000 UI/ml Laboratórios Organon do Brasil Ltda.

\*\* PREGNIL - 1.500 UI/ml Laboratórios Organon do Brasil Ltda.

\*\*\* BIOVET - 209 Laboratório Bio-Vet.

\*\*\*\* KETALAR - Laboratório Parke-Davis.

\*\*\*\*\* ROMPUN - Bayer do Brasil.

\*\*\*\*\* ETER ANESTESICO - Rhodia S.A.

O número de ovulações e a fertilidade observada nos Grupos III e IV de receptoras não revelaram diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ), o que está de acordo com HULOT & POUJARDIEU, 12 (1976). No que se refere ao número de ovulações das receptoras, os resultados do grupo de animais tratados com HCG mostraram-se superiores aos obtidos por FUJIMOTO et alii, 6 (1974). Nas receptoras acasaladas com macho vasectomizado, o número de ovulações foi superior aos valores citados por FUJIMOTO et alii, 6 (1974) e HULOT & POUJARDIEU, 12 (1976).

O índice de recuperação de embriões obtido no Grupo I aproxima-se dos resultados de EL-BANNA & SACHER, 5 (1976) e é superior ao de ROJAS O. et alii, 14 (1978). A diferença estatisticamente significativa encontrada entre os Grupos I e II não foi citada na literatura levantada.

No tocante ao estágio do desenvolvimento dos embriões a maioria se encontrava no estágio de mórula concordando com as observações de TSUTSUMI & OGURI, 18 (1972) e TSUNODA et alii, 17 (1978), mas diferindo de SUGIE et alii, 16 (1982) que considera este período próprio de blastocisto. A maioria dos embriões foi encontrada no útero, o que segue as observações de TSUNODA et alii, 17 (1978). A diferença estatística encontrada entre os Grupos I e II mostra que os animais que receberam HCG apresentaram maior número de embriões no útero do que os animais acasalados. Considerando que estes animais possuem maior quantidade de progesterona devido ao maior número de ovulações, possivelmente a variação entre os grupos possa ser explicada pelo trabalho de HODGSON & TALD, 10 (1978). A localização dos embriões no Grupo I deste trabalho assemelha-se à encontrada por TSUNODA et alii, 17 (1978) enquanto que o do Grupo II se aproximou dos resultados de EL-BANNA & SACHER, 5 (1976).

O índice de gestação obtido no Grupo III foi inferior aos resultados encontrados por ROJAS O. et alii, 14 (1978), porém os resultados de qualquer dos grupos foi superior ao de KILIÇOGLU & TEKELI, 13 (1981).

A transferência de embriões por via cervical, utilizada por DAUZIER, 4 (1962) e a realizada por ADAMS, 2 (1962) mediante punção uterina, revelaram número de embriões implantados superiores aos encontrado neste trabalho.

Considerando-se as perdas embrionárias a maioria ocorreu antes ou logo após a implantação, uma vez que foram encontradas apenas 5 placentas sem fetos, por volta do 15<sup>o</sup> dia de gestação, o que difere de ADAMS, 3 (1960) que encontrou perdas mais tardias.

Pela análise estatística não foi encontrada diferença significativa entre

os Grupos III e IV.

## CONCLUSOES

Os resultados obtidos, nas condições do presente experimento, sugerem as seguintes conclusões:

- 150 UI de PMSG são capazes de provocar superovulação em coelhas;
- o HCG é necessário para estimular a ovulação de coelhas tratadas com PMSG e acasaladas 2 ou 3 vezes;
- o HCG afeta a migração dos embriões, alterando a localização;
- não há diferença estatística entre as técnicas de transferência e sincronização utilizadas.

WISCHRAL, A.; MATERA, A.; BIZUTTI, O.; VISINTIN, J.A. Contribution to the study of embryo transfer in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 26(1):121-128, 1989.

SUMMARY: Two groups of donor rabbits were injected intramuscularly with 150 IU of PMSG to cause superovulation and after 72 hours, the donors were mated and administered 100 IU of HCG intravenously or simply mated. Another two groups of receptor female rabbits were synchronized with 100 IU of HCG by intravenous injection or mated to vasectomized male. The transfer of apparently good embryos through the cervix or uterine punctation has revealed, after 15 days, 10.06  $\pm$  4.9 and 8.83  $\pm$  0.98 ovulations and 40.0 and 66.6% of pregnancies for the receptor groups. Among the donors were observed 33.75  $\pm$  21.36 and 9.84  $\pm$  10.41 ovulations and embryo implantation rates of 88.39 and 60.94%. It was not observed any statistical difference between the ways of embryo transference.

UNITERMS: Reproduction of rabbit; Fertility; Ovulation; Embryo transfer; Human chorionic gonadotrophin; Pregnant mares serum

TABELA 1 - Número de ovulações e de embriões colhidos, estágio do desenvolvimento e localização do embriões com as respectivas médias aritméticas ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (s), obtidos nos animais do Grupo I. São Paulo, 1987.

No. da Coelha	No. de Ovulações	No. de embriões colhidos	Estágio do Desenvolvimento			Localização	
			Mórula	Blastocisto	Degenerado	Utero	Oviduto
1	45	42	42	-	-	-	42
2	30	23	23	-	-	20	03
3	30	29	29	-	-	17	12
4	07	06	06	-	-	06	-
5	37	20	20	-	-	20	-
6 (b)	115	44	44	-	-	44	-
7	12	09	09	-	-	-	09
8	44	41	14	-	27	37	04
9	64 (a)	54	53	-	01	49	05
10	75	75	75	-	-	75	-
11	27	25	25	-	-	24	01
12	04 (a)	04	04	-	-	03	01
13	30 (a)	30	27	02	01	01	29
Total	405	358 (88,39%)	327	02	29	294	64
$\bar{x}$	33,75	29,83	27,25	0,16	2,41	24,50	5,33
s	21,36	20,74	20,75	0,57	7,75	22,69	8,40

(a) - ovários que possuíam folículos hemorrágicos

(b) - animal excluído da análise estatística por apresentar valor extremamente alto

TABELA 2 - Número de ovulações e de embriões colhidos, estágio do desenvolvimento e localização dos embriões com as respectivas médias aritméticas ( $\bar{x}$ ) e desvio padrão (s), obtidos nos animais do Grupo II. São Paulo, 1987.

Coelha	No. de Ovulações	No. de embriões colhidos	Estágio do Desenvolvimento			Localização	
			Mórula	Blastocisto	Degenerado	Utero	Oviduto
14	06 (b)	04	-	-	04	04	-
15	09	07	06	01	-	07	-
16	04 (b)	03	03	-	-	-	03
17	06 (b)	-	-	-	-	-	-
18	02 (b)	01	01	-	-	-	01
19	27	13	13	-	-	13	-
20	04 (b)	-	-	-	-	-	-
21	- (b)	-	-	-	-	-	-
22	21 (a)	20	19	-	01	09	11
23	- (a) (b)	-	-	-	-	-	-
24	01 (a) (b)	-	-	-	-	-	-
25	29 (a)	15	14	-	01	11	04
26	19	15	13	-	02	02	13
Total	128	78 (60,94%)	69	01	08	46	32
$\bar{x}$	9,84	6,00	5,30	0,07	0,61	3,53	2,46
s	10,41	7,22	6,92	0,27	1,19	4,80	4,44

(a) ovários que possuíam folículos hemorrágicos

(b) ovários repletos de folículos que não ovularam

TABELA 3 - Número de ovulações, de fetos viáveis e prenhez, com as respectivas médias aritméticas ( $\bar{x}$ ), desvio padrão (s) e valores percentuais (%), obtidos nos animais do Grupo III. São Paulo, 1987.

No. da Coelha	No. de Ovulações	No. de fetos viáveis		Total	Prenhez
		cornos esquerdo	cornos direito		
27	09	0	01	01	+
28	07	0	0	0	-
29	14	03	02	05	+
30	0	0	0	0	-
31	06	0	0	0	-
32	12	04	03	07	+
33	18	02	02	04	+
34	16	01	05	06	+
35	05	0	0	0	-
36	07	0	0	0	-
37	08	0	0	0	-
38	10	0	0	0	-
39	17	01(d=1)	0	01	+
40	12	0	0	0	-
41	10	0	0	0	-
Total	151	11 (14,66%)	13 (17,33%)	24 (16%)	06 (40%)
$\bar{x}$	10,06	0,73	0,86	1,60	-
s	4,90	1,27	1,50	2,52	-

(d) número de placentas sem fetos

Contribuição para o estudo da transferência de embriões em coelhas

TABELA 4 - Número de ovulações, de fetos viáveis e prenhez, com as respectivas médias aritméticas ( $\bar{x}$ ), desvio padrão (s) e valores percentuais (%), obtidos nos animais do Grupo IV. São Paulo, 1987.

No. da Coelha	No. de Ovulações	No. de fetos viáveis		Total	Prenhez
		Corno esquerdo	corno direito		
42	09	0	05	05	+
43	09	0	0(d=2)	0	-
44	09	0	0	0	-
45	10	02	0(d=1)	02	+
46	07	04	04	08	+
47	09	02	01(d=1)	03	+
Total	53	08(26,6%)	10(33,3%)	18(30%)	04(66,6%)
$\bar{x}$	8,83	1,33	1,66	3,00	-
s	0,98	1,63	2,25	3,09	-

(d) número de placentas sem fetos

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 - ADAMS, C.E. Egg transfer in the rabbit. In:----- Mammalian egg transfer. Florida, CRC Press, 1982. p.29-48.
- 2 - ADAMS, C.E. Studies on prenatal mortality in the rabbit *Oryctolagus cuniculus*: the effect of transferring varying numbers of eggs. J. Endocr., 24:471-490, 1962.
- 3 - ADAMS, C.E. Prenatal mortality in the rabbit *Oryctolagus cuniculus*. J. Reprod. Fertil., 1:36-44, 1960.
- 4 - DAUZIER, L. Nouvelles donnés sur la transplantation des oeufs, chez la lapine, par voie vaginale ou intrapéritoniale. Ann. Biol. anim., 2: 17-23, 1962.
- 5 - EL-BANNA, A.A. & SACHER, B. Egg transport in ovariectomized rabbits as affected by different combinations of oestrogen and progesterone. J. Endocr., 68:331-340, 1976.
- 6 - FUJIMOTO, S.; RAWSON, J.M.R.; DUKELOW, W.R. Hormonal influences on the time of ovulation in the rabbit as determined by laparoscopy. J. Reprod. Fertil., 38:97-103, 1974.
- 7 - GREEN, C.J.; KNIGHT, O.; PRECIOUS, S.; SIMPKIN, S. Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 years experience. Lab. Anim., 15:163-170, 1981.
- 8 - GREGORY, P.W. The potential and actual fecundity of some breeds of rabbits. J. exp. Zool., 62:271-285, 1932.

- 9 - HEARPE, 1891 apud BETTERIDGE, K.J. An historical look at embryo transfer. *J. Reprod. Fertil.*, 62:1-13, 1981.
- 10 - HODGSON, B.J. & TALO, A. Spike bursts in rabbit oviduct. II. Effects of estrogen and progesterone. *Amer. J. Physiol.*, 234:E439-E443, 1978.
- 11 - HOLTZ, W. & FOOTE, R.H. Cannulation and recovery of spermatozoa from the rabbit ductus deferens. *J. Reprod. Fertil.*, 39:89-92, 1974.
- 12 - HULOT, F. & POUJARDIEU, B. Induction artificielle de l'ovulation et fertilité chez la lapine (*Oryctolagus cuniculus*) allaitante ou non. *Ann. Biol. anim.*, 16:635-643, 1976.
- 13 - KILIÇOĞLU, C. & TEKELI, T. /Embryo transfer in the rabbit/. *Ankara Univ. vet. Fak. Derg.*, 28:23-35, 1981.
- 14 - ROJAS O., F.; WALBAUM, W.V.; BASCUNAN, N.J.; ARRAU, E.J.; ROBLERO, S.L.; MUNOZ, M.G.; CANAS, C.R. Transferencia de embriones en conejas. *Arch. Med. vet.*, Valdivia, 10:191, 1976.
- 15 - ROTTMANN, O. & STRANZINGER, G. Ergebnisse der Superovulation beim Kaninchen durch einmalige PMSG-Applikation bei zwei Zuchtlinien. *Zuchthygiene*, 12:14-18, 1977.
- 16 - SUGIE, T.; SEIDEL JUNIOR, G.E.; HAFEZ, E.S.E. Transferência de embriões. In: HAFEZ, E.S.E. *Reprodução animal*. São Paulo, Manole, 1982. p.659-688.
- 17 - TSUNODA, Y.; IRITANI, A.; NISHIKAWA, Y. /Studies on superovulation in the rabbit with special reference to repeated superovulation/. *Jap. J. zootech. Sci.*, 49:89-95, 1978.
- 18 - TSUTSUMI, Y. & OGURI, N. Some observations on the embryo's arrangement in rabbit uterine horns. *J. Fac. Agr., Hokkaido*, 57:61-69, 1972.
- 19 - TSUTSUMI, Y.; TERAMI, Y.; SUZUKI, H.; SAITO, S. Effects of prostaglandin F<sub>2</sub>alpha on egg recovery from the vagina and egg transport in superovulated rabbits. *J. Fac. Agr., Hokkaido*, 59:312-321, 1979.

Recebido para publicação em 01/12/88  
Aprovado para publicação em 05/04/89