



Estudos para o incremento da produção de embriões *in vivo* e *in vitro* em vacas de corte taurinas e sintéticas

Studies to improve in vivo and in vitro embryo production in beef cows from taurine and synthetic breeds

Wagner Marques de Lima¹, Monique Mazzarollo Frata², Monique Tomazele Rovani³, Rafael Gianella Mondadori⁴, Bernardo Garziera Gasperin⁵

¹Biotec Biotecnologia. wagner@biotec.vet.br, ²Biotec Biotecnologia; Universidade Federal de Pelotas; moniquefrata@hotmail.com, ³Universidade Federal do Rio Grande do Sul; FiBRA-RS mtrovani@gmail.com, ⁴Universidade Federal de Pelotas; FiBRA-RS rgmondadori@gmail.com, ⁵Universidade Federal de Pelotas; FiBRA-RS bggasperin@gmail.com

Resumo

O Brasil destaca-se por ser um dos líderes mundiais na produção *in vitro* de embriões, o que é decorrente do rebanho nacional ser predominantemente composto por raças zebuínas, que possuem maior número de folículos antrais aspiráveis. Por outro lado, vacas taurinas apresentam menor população folicular antral, o que limita o número de ovócitos obtidos por seção de aspiração folicular (*ovum pick-up*; OPU). Portanto, na região Sul do Brasil há demanda para produção tanto *in vivo* como *in vitro* de embriões de doadoras de raças taurinas e sintéticas. Este texto discute estudos recentes que buscam estratégias para aperfeiçoar as etapas envolvidas na produção de embriões bovinos, bem como para aumentar o aproveitamento de receptoras utilizadas nos programas de transferência de embriões (TE), com foco em vacas taurinas e sintéticas.

Palavras-chave: superovulação, transferência de embriões, receptoras, hormônios.

Abstract

Brazil stands among the leaders on *in vitro* embryo production, as the Brazilian herd is predominantly composed by Zebu breeds, which have a greater number of antral follicles available to ovum pick-up (OPU). On the other hand, taurine cows have a lower antral follicle population, which limits the number of oocytes obtained by each OPU section. Therefore, in the Brazilian Southern region there is a demand for both *in vivo* and *in vitro* production of embryos from donors of taurine and synthetic breeds. This text discusses recent studies that seek strategies to improve the steps involved in the production of bovine embryos, as well as to increase the use of recipients in embryo transfer (ET) programs, focusing on taurine and synthetic cows.

Keywords: superovulation, embryo transfer, recipient cows, hormones

Introdução

A biotécnica de inseminação artificial (IA) possibilita ampla difusão de material genético de touros, sendo utilizada em 23,5% das matrizes de corte no Brasil (ASBIA, 2022). A IA, que pode ser realizada em tempo fixo (IATF), possibilita que touros superiores tenham milhares ou até centenas de milhares de descendentes. Por outro lado, a multiplicação do número de descendentes de fêmeas bovinas geneticamente superiores é mais complexa, sendo inicialmente realizada por meio da superovulação (SOV), IA e coleta dos embriões, ou seja, pela produção *in vivo* de embriões. Posteriormente, a técnica de aspiração de ovócitos e maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário em laboratório, ou seja, produção *in vitro* (PIV), foi desenvolvida e aprimorada. Estima-se que as biotécnicas relacionadas à produção de embriões em animais são utilizadas em 28,7% dos países no mundo sendo que, entre 2020 e 2021, houve aumento de 25,6% na produção de embriões bovinos considerando as técnicas de produção *in vivo* e *in vitro* (Viana, 2022).

No Brasil, a PIV tem sido a técnica de eleição para aumentar o número de descendentes de fêmeas zebuínas (*Bos indicus*), que possibilitam maior número de ovócitos por seção de OPU, em comparação às taurinas (*Bos taurus*). Porém, na região Sul do Brasil, raças taurinas e sintéticas representam a maior parte do rebanho. Nessas raças, especialmente nas taurinas puras, são obtidas menores quantidades de ovócitos



por OPU, o que muitas vezes inviabiliza a técnica. Considerando que na nesta região são produzidos reprodutores de alto valor genético de raças de corte taurinas e sintéticas, que são utilizados na IA em todo o Brasil, há demanda para produção de embriões tanto *in vivo* (raças taurinas) como *in vitro* (raças sintéticas).

Portanto, nosso grupo de pesquisa tem estudado como aprimorar as diferentes etapas envolvidas na multiplicação de descendentes de fêmeas bovinas geneticamente superiores. Na presente revisão serão discutidos estudos recentes buscando o aprimoramento das biotécnicas de produção *in vivo* e *in vitro* de embriões bovinos, com foco em raças de corte taurinas e sintéticas.

Superovulação e produção *in vivo* de embriões em raças taurinas e sintéticas

Conforme mencionado anteriormente, a produção *in vivo* de embriões foi a primeira abordagem para a multiplicação de descendentes de fêmeas bovinas, e tem sido utilizada há mais de 40 anos. As principais limitações da técnica são a variabilidade na resposta à superovulação (SOV) e na produção de embriões, além do alto custo do tratamento hormonal. Como fêmeas bovinas são monovulatórias, é necessário suplementar gonadotrofinas, especialmente hormônio folículo estimulante (FSH), para possibilitar o crescimento e ovulação de múltiplos folículos. No entanto, há marcada variação individual no número e capacidade de desenvolvimento de folículos ovarianos mediante a suplementação de FSH exógeno. Inúmeros fatores como composição genética, condição corporal, idade, paridade, estação do ano, tipo de gonadotrofina utilizada para estimulação ovariana e o *status* ovariano no início do tratamento influenciam a resposta superovulatória (revisado por Mikkola *et al.* (2019)). Assim, diversos aspectos têm sido investigados quanto aos efeitos sobre a resposta aos tratamentos superovulatórios, bem como estratégias para aumentar a taxa de fecundação e de desenvolvimento embrionário.

No que se refere à resposta à SOV, sabe-se que é afetada negativamente quando não é iniciada no momento da emergência de uma nova onda folicular, ou seja, quando já há dominância folicular estabelecida. Nestes casos, a ablação folicular guiada por ultrassom (Baracaldo *et al.*, 2000), ou por método manual (Lima *et al.*, 2007), permite mitigar o problema com a remoção do folículo dominante. No caso da ablação manual, demonstrou-se que a realização do procedimento 24 h antes, ou no início das aplicações de FSH repercutiu em aumento no número de embriões viáveis ($10,9 \pm 0,89$ e $10,3 \pm 0,94$, respectivamente) em comparação com fêmeas com folículos palpáveis não removidos ($6,4 \pm 0,67$).

O perfil endócrino da doadora também pode afetar a resposta à SOV e a produção embrionária. Há duas metodologias de SOV, sendo que a primeira depende do estro natural ou sincronizado (estro base - SOV/EB) para iniciar a aplicação de FSH oito a doze dias depois do estro e, portanto, a SOV é realizada na presença de progesterona (P4) endógena do corpo lúteo (CL) da doadora. A segunda abordagem utiliza tratamentos hormonais em fase aleatória do ciclo estral para sincronizar o início de uma onda de crescimento folicular (SOV em tempo fixo – SOV/TF).

Um estudo realizado na América do Norte, com vacas Angus e Simental, mostrou que maiores concentrações de P4 durante o período de tratamento com FSH possibilitaram a obtenção de maior número de embriões totais (19,3 – P4 alta vs. 10,7 – P4) e transferíveis (11 – P4 alta vs. 7,9 – P4 baixa) (Wiley *et al.*, 2019). No referido estudo, os autores compararam a SOV realizada apenas com CIDR, sem CL (P4 baixa), ou com CIDR na presença de um CL (P4 alta). Recentemente, nosso grupo de pesquisa observou que vacas doadoras de embriões que apresentam menores concentrações de P4 no início da suplementação com FSH em protocolo SOV/EB apresentam maiores taxas de estruturas não fecundadas. Portanto, em um segundo estudo testou-se a suplementação de P4 por meio de dispositivo vaginal (DIV) contendo 1 g de P4 no dia anterior ao início do FSH do protocolo SOV/EB. Conforme esperado, a inserção de DIV proporcionou aumento nas concentrações séricas de P4. Não foi observado efeito do tratamento com P4 no total de estruturas e proporção de degenerados; entretanto, a inserção do DIV contendo P4 aumentou a proporção de estruturas não fecundadas. A taxa de embriões, proporção de embriões qualidade 1 e número total de embriões não diferiu entre os grupos. Portanto, conclui-se que para a realização de SOV/EB não há benefícios com a suplementação de P4 exógena.

Um potencial avanço para a SOV foi o recente desenvolvimento de formulações de FSH recombinante (rFSH), considerando a baixa disponibilidade, variações no grau de pureza e potenciais riscos sanitários das formulações de FSH purificado (pFSH) de hipófise, convencionalmente utilizadas. Um estudo recente (Gutiérrez-Reinoso *et al.*, 2023) observou número de folículos similar em novilhas da raça Holandês superovuladas com rFSH (4 administrações) e pFSH (8 administrações), e maior número de CLs nas fêmeas tratadas com rFSH. Os mesmos autores obtiveram maior número de embriões transferíveis nas



novilhas superovuladas com rFSH ($7,20 \pm 1,27$) em comparação com pFSH ($4,03 \pm 1,62$). Embora os dados sejam promissores, a formulação de rFSH utilizada no estudo ainda não está disponível comercialmente.

No tocante à IA e fecundação, o tratamento com baixa dose de prostaglandina F_{2α} (PGF) no momento da IATF aumentou a taxa de concepção em vacas (Ambrose *et al.*, 2015). Com base em estudos que sugerem efeito positivo da PGF na ovulação e/ou fecundação, nosso grupo testou se o tratamento com PGF (482μg de cloprostenol sódico) na primeira IA em vacas superovuladas (SOV/EB) poderia trazer benefícios na fecundação e desenvolvimento embrionário. Foram obtidos dados de 70 coletas de embriões, sendo que cada doadora (n = 35) foi submetida a dois ciclos, um tratado com PGF e um não tratado (controle). Não foi observado efeito do tratamento sobre o número de corpos lúteos, nem sobre o número de estruturas coletadas, sendo obtidas, em média, mais de 14 estruturas por doadora. A mediana (IC 95%) para estruturas totais nos grupos controle e PGF, respectivamente, foram 12 (10-18) e 15 (12-18), enquanto para embriões viáveis foi de 9 (7-11) e 7 (6-10) (Frata *et al.*, 2023). Portanto, a hipótese de que a PGF poderia melhorar a fecundação não foi confirmada.

Aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões em raças taurinas e sintéticas

Entre as principais vantagens da produção *in vitro* de embriões podemos citar a possibilidade de realizar OPU em fase aleatória do ciclo estral, evitando gastos com tratamentos hormonais e reduzindo o número de manejos das doadoras. Além disso, é possível otimizar o uso de sêmen de elevado valor. Devido a essas vantagens, em 2021, a PIV representou 79,7% dos embriões produzidos no mundo (Viana, 2022). Porém, no caso de fêmeas taurinas, o reduzido número de folículos antrais aspiráveis pode inviabilizar a técnica. No estudo de Gimenes *et al.* (2015), após a sincronização hormonal da onda folicular foi observada marcada diferença entre vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* na média de folículos visualizados ($38,8 \pm 3,0$ vs. $23,1 \pm 2,6$), complexos cumulus ovócitos (CCOs) totais ($35,2 \pm 4,8$ vs. $13,8 \pm 1,8$) e CCOs viáveis ($24,7 \pm 3,5$ vs. $7,1 \pm 1,1$), demonstrando a marcada diferença entre as subespécies. Portanto, alternativas que possibilitem o controle da função ovariana para aumentar o número e a qualidade dos ovócitos aspirados em vacas taurinas devem ser investigadas.

Uma alternativa para aumentar o número e qualidade dos CCOs é o tratamento prévio com FSH, amplamente utilizado no Canadá e Europa (em mais de 99% dos procedimentos). Doses de FSH muitas vezes similares às utilizadas na SOV são administradas anteriormente à OPU, aumentando significativamente o custo do procedimento. No restante dos países da América do Norte, Oceania e América do Sul, o tratamento com FSH previamente à OPU representa menos de 3% dos procedimentos (Viana, 2022). O elevado custo e a baixa disponibilidade comercial do FSH limita sua ampla utilização no Brasil e, portanto, alternativas devem ser buscadas.

Para testar a hipótese de que a sincronização da emergência da onda folicular possibilita aumentar o número e qualidade das estruturas aspiradas, vacas *Bos taurus* foram alocadas em dois grupos: controle, sem sincronização; ou tratamento, que consistiu na sincronização da onda folicular com hormônios injetáveis (dados não publicados). A sincronização consistiu na aplicação de 2 mg de benzoato de estradiol (BE), 150 μg de D-cloprostenol (PGF) e 300 mg de progesterona injetável de longa ação (P4iLA), objetivando a indução de uma nova onda folicular simultaneamente. Seis dias após o tratamento, as vacas foram aspiradas, totalizando 44 procedimentos (n=22/grupo). O tratamento modulou o perfil endócrino das vacas, porém, o grupo controle apresentou maiores concentrações de P4 ($2,8 \pm 0,8$ ng/mL) em comparação ao tratamento ($1,1 \pm 0,2$ ng/mL). Não foi observado efeito sobre o número de estruturas aspiradas (14 estruturas por procedimento), nem sobre a taxa de desenvolvimento embrionário (mediana de 28% e 33% para controle e tratamento, respectivamente).

Sincronização de receptoras para transferência de embriões

A seleção de receptoras com adequado suporte nutricional e sanitário é indispensável para o sucesso de um programa de TE. Além disso, diversos protocolos hormonais têm sido utilizados para a sincronização do estro e ovulação, possibilitando a transferência dos embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro* para um útero com ambiente condizente com a fase de desenvolvimento. Para programas de TE em escala comercial, a TE em tempo fixo (TETF), ou seja, sem a necessidade de observação de estro, é amplamente utilizada. No Brasil, a maioria dos protocolos hormonais iniciam com a administração de BE e um DIV contendo P4 (D0), além de administração de um agente luteolítico e suplementação com eCG, um ou dois dias antes da remoção do DIV, ou no momento da remoção do DIV. Finalmente, faz-se



necessário administrar um indutor de ovulação que pode ser BE, cipionato de estradiol (CE), GnRH ou hCG. Devido ao baixo custo e facilidade de manejo o CE é amplamente utilizado, aumentando a chance de manifestação de estro, porém, a sincronia da ovulação é maior quando o GnRH é utilizado. Com base no exposto, em um estudo recente comparamos o efeito aditivo do CE+GnRH em comparação ao tratamento apenas com GnRH na indução da ovulação de receptoras (n = 184) (Lima *et al.*, 2022). Não foi observada diferença entre as duas abordagens quanto à taxa de aproveitamento das receptoras (GnRH: 84,8% e CE+GnRH: 81,5%), nem nas concentrações séricas de P4 nos dias 6 e 13 após GnRH. A taxa de prenhez por TE (P/TE) também não diferiu entre os grupos (GnRH: 62,8% e CE+GnRH: 58,7%), indicando que o tratamento com GnRH isoladamente é suficiente.

Considerações finais

Estratégias para otimizar a produção *in vivo* e *in vitro* de embriões ainda são necessárias considerando que, especialmente para raças taurinas, houve pouca evolução. As médias de embriões transferíveis obtidas com os protocolos hormonais atuais são similares às descritas há décadas. No que se refere à OPU e PIV, embora seja viável para raças zebuínas e sintéticas, ainda se faz necessário desenvolver abordagens que possibilitem maior número e qualidade dos CCOs obtidos em vacas taurinas.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos órgãos de fomento FAPERGS (outorga 22/2551-0000391-5 e 21/2551-0002278-7) e CNPq (processo #310932/2021-1 e 406866/2022-8).

Referências

- Ambrose DJ, Gobikrushanth M, Zuidhof S, Kastelic JP.** Low-dose natural prostaglandin F2 α (dinoprost) at timed insemination improves conception rate in dairy cattle. *Theriogenology*, v.83, n.4, p.529-34, 2015.
- Asbia. INDEX ASBIA. <https://asbia.org.br/index-asbia/> 2022.
- Baracaldo MI, Martínez MF, Adams GP, Maplettoff RJ.** Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology*, v.53, n.6, p.1239-50, 2000.
- Frata MM, Lima WMD, Lima DCM, Silveira DHD, Lucia Júnior T, Ferreira R, Gonçalves PBD, Gasperin BG.** Prostaglandin F2 α treatment concurrent with artificial insemination does not affect bovine embryo production. *Ciência Rural*, v.53, 2023.
- Gimenes LU, Ferraz ML, Fantinato-Neto P, Chiaratti MR, Mesquita LG, Sa Filho MF, Meirelles FV, Trinca LA, Renno FP, Watanabe YF, Baruselli PS.** The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect *in vitro* embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. *Theriogenology*, v.83, n.3, p.385-93, 2015.
- Gutiérrez-Reinoso MA, Arreseigor CJ, Driedger B, Cabezas I, Hugues F, Parra NC, Sánchez O, Toledo JR, Garcia-Herreros M.** Effects of recombinant FSH (bscrFSH) and pituitary FSH (FSH-p) on embryo production in superovulated dairy heifers inseminated with unsorted and sex-sorted semen. *Animal Reproduction Science*, v.252, p.107226, 2023.
- Lima WM, De Moraes FP, Ferreira R, Mondadori RG, Vieira AD, Knabah NW, Lima DCM, Rovani MT, Pfeifer LFM, Gonçalves PBD, Gasperin BG.** Does combining estradiol cypionate and GnRH for ovulation induction in recipient cows increase pregnancy rate after timed embryo transfer? *Anim Reprod*, v.19, n.3, p.e20220067, 2022.
- Lima WM, Vieira AD, Neto AT, Mezzalira A, Matos RC, Gregory RM.** Improved superovulatory response in beef cattle following ovarian follicular ablation using a simplified transvaginal device. *Animal Reproduction Science*, v.100, n.3, p.364-370, 2007.
- Mikkola M, Hasler JF, Taponen J.** Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. *Reprod Fertil Dev*, v.32, n.2, p.104-124, 2019.
- Viana HM.** 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, v.40, n.4, p.22-40, 2022.
- Wiley C, Jahnke M, Redifer C, Gunn PJ, Dohman T.** Effects of endogenous progesterone during ovarian follicle superstimulation on embryo quality and quantity in beef cows. *Theriogenology*, v.129, p.54-60, 2019.