



Desafios e perspectivas na produção comercial de embriões *in vivo* e *in vitro* de raças taurinas e sintéticas

Current challenges and perspectives of in vivo and in vitro commercial embryo production of taurine and synthetic breeds

Wagner Marques de Lima¹, Monique Mazzarollo Frata², Monique Tomazele Rovani³, Rafael Gianella Mondadori⁴, Arnaldo Diniz Vieira⁵, Rogério Ferreira⁶, Bernardo Garziera Gasperin⁷

¹Biotec Serviços de Apoio a Pecuária LTDA. wagner@biotec.vet.br, ²Biotec Serviços de Apoio a Pecuária LTDA; 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 vieira_ad@yahoo.com.br, ⁶Universidade do Estado de Santa Catarina; FiBRA-RS rogerio.ferreira@udesc.br, ⁷Universidade Federal de Pelotas; FiBRA-RS bggasperin@gmail.com

Resumo

As biotécnicas de produção *in vivo* e *in vitro* de embriões bovinos permitem aumentar significativamente o número de descendentes de fêmeas genética e/ou zootecnicamente importantes. Porém, antes de se optar por um dos métodos, deve-se avaliar suas peculiaridades. A produção *in vivo* pode ser empregada de forma satisfatória tanto em zebuínos quanto em raças sintéticas e taurinas, permitindo a obtenção de, em média, seis a sete embriões viáveis por coleta, com boa tolerância à criopreservação. Já a produção *in vitro* é mais eficiente em raças zebuínas e sintéticas, visto que possuem maior número de folículos antrais aspiráveis. Além disso, esta técnica permite a produção de embriões sem estímulos hormonais exógenos, porém com menor criotolerância. Desse modo, a presente revisão discute os desafios atuais e perspectivas futuras na produção de embriões *in vivo* e *in vitro* com base nos dados da rotina de uma central de doadoras e laboratório de produção de embriões que desenvolve simultaneamente ambas as técnicas de produção de embriões na região Sul do Brasil.

Palavras-chave: criopreservação, aspiração folicular, superovulação.

Abstract

Biotechniques for in vivo and in vitro production of bovine embryos allow to significantly increase the number of descendants from cows genetically and/or zootechnically superior. However, before opting for one of the methods, one should evaluate its peculiarities. In vivo production can be used satisfactorily both in zebu cattle and in synthetic and taurine breeds, allowing to obtain, on average, six to seven viable embryos per procedure, with good tolerance to cryopreservation. In vitro production is more efficient in Zebu and synthetic breeds, since they have a greater number of aspirable antral follicles. In addition, this technique allows the production of embryos without exogenous hormonal stimuli, but with lower cryotolerance. This review discusses current challenges and future perspectives in in vivo and in vitro embryo production based on routine data from an embryo production center and a laboratory that develop, simultaneously, the two embryo production techniques in southern Brazil.

Keywords: cryopreservation, ovum pick-up, superovulation.

Introdução

A multiplicação do número de descendentes de fêmeas bovinas genética e/ou zootecnicamente superiores pode ser obtida com o emprego das biotécnicas de produção *in vivo* ou *in vitro* de embriões. No Brasil, a produção de embriões *in vivo* iniciou na década de 70 e foi amplamente utilizada tanto em raças taurinas quanto em zebuínas. Porém, após o desenvolvimento da aspiração folicular guiada por ultrassom (*ovum pick up* - OPU), a produção *in vitro* de embriões (PIV) superou significativamente a produção *in vivo* em zebuínos e sintéticos. Atualmente, devido à elevação nos custos do tratamento hormonal e à flutuação na oferta de FSH necessário para a superovulação (SOV) e produção *in vivo*, a PIV vem ganhando espaço na produção de embriões em taurinos, sendo a técnica mais utilizada mundialmente (Viana, 2022).

A região Sul do Brasil é caracterizada por um rebanho predominantemente composto por raças



taurinas e sintéticas, possibilitando um cenário adequado para a avaliação das duas técnicas de produção de embriões. Nessa região são produzidos reprodutores de alto valor genético de raças de corte taurinas e sintéticas, que são utilizados na inseminação artificial (IA) em rebanhos de todo o Brasil.

Na presente revisão serão discutidas a situação atual e as perspectivas futuras com base na rotina e na opinião de uma equipe que conduz paralelamente as técnicas de produção *in vitro* e *in vivo* de embriões bovinos. Ainda, serão apresentados dados ilustrativos obtidos de rotinas comerciais, bem como discutidos os desafios e as demandas para aumentar a viabilidade econômica das referidas técnicas.

Produção *in vivo* de embriões

A produção *in vivo* de embriões foi a primeira técnica utilizada para aumentar o número de descendentes de fêmeas bovinas. Apesar de bem estabelecida, a técnica tem sido superada pela PIV, desde 2015, no número de embriões produzidos anualmente (Viana, 2022). Tradicionalmente, a principal limitação da técnica está relacionada à variabilidade na resposta à SOV, que é devida a vários fatores (revisado por Mikkola *et al.* (2019). Mais recentemente, a drástica elevação no custo do tratamento hormonal (aumento superior a 300% em quatro anos) e oscilações na disponibilidade de FSH purificado (FSHp), tem representado entraves significativos para a técnica. Por isso, na visão dos autores, há necessidade do desenvolvimento de abordagens que possibilitem menor variação na resposta superovulatória, menor número de manejos, alternativas para diminuir a dose, ou até mesmo substituir as formulações de FSHp, bem como estratégias para aumentar a taxa de fecundação e desenvolvimento embrionário.

No que se refere a resposta à SOV, em um levantamento avaliando mais de seis mil coletas de embriões *in vivo* realizadas ao longo de seis anos, não foi observada oscilação significativa ao longo das estações do ano no número de estruturas totais e proporção de embriões viáveis. Entretanto, observou-se aumento na proporção de estruturas não fecundadas (NF) durante o verão e de estruturas degeneradas durante o outono (dados não publicados). Essas oscilações podem ser consequências do estresse térmico, que afeta a taxa de ovulação, fecundação e de embriões viáveis (Ratchamak *et al.*, 2021), bem como de flutuações na oferta nutricional. Portanto, entende-se que a melhora na nutrição, ambiência e o maior controle da ovulação e fecundação podem mitigar os efeitos das diferentes condições ambientais ao longo do ano.

Uma abordagem utilizada na rotina para melhorar a resposta à SOV tem sido a ablação folicular (remoção do folículo dominante) previamente ao tratamento com FSH, que tem repercutido no aumento de embriões transferíveis (Baracaldo *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2007). A manipulação do perfil endócrino das doadoras por meio da suplementação de progesterona (P4) também melhorou a resposta à SOV no estudo de Wiley *et al.* (2019). Entretanto, avaliando mais de 100 coletas de embriões na rotina comercial da empresa, não foi observado efeito positivo da suplementação de P4 na produção de embriões de doadoras superovuladas com protocolo convencional usando estro-base (EB), ou seja, na presença de um corpo lúteo (CL) viável (dados não publicados). Brevemente, entre 8 e 12 dias após o EB, realiza-se avaliação ginecológica (dia zero - D0) a fim de detectar a presença de um CL e fazer a ablação de folículos > 8 mm. No dia seguinte (D1), inicia-se a SOV com a aplicação de oito doses decrescentes de FSHp, em intervalos de 12 h, totalizando 120 a 300 mg de FSHp (varia conforme a raça e respostas às SOVs anteriores). Juntamente com a sexta e sétima dose de FSH, é administrada prostaglandina (PGF) para induzir a luteólise e garantir a redução nos níveis de P4. A partir desse momento, os animais são monitorados para detecção do início do estro, quando é administrada uma dose de análogo de GnRH. As IA são realizadas 12 e 24 h após a aplicação do GnRH. A coleta de embriões é realizada seis dias após a segunda IA. O protocolo descrito está bem estabelecido, sendo utilizado há décadas pela empresa, com resultados consistentes.

O recente desenvolvimento de formulações de FSH recombinante (rFSH) parece promissor para contornar as flutuações na disponibilidade comercial, variações na pureza, potenciais riscos sanitários e, possivelmente, o elevado custo do FSHp. Resultados promissores foram relatados por Gutiérrez-Reinoso *et al.* (2023), que obtiveram maior número de embriões transferíveis em novilhas superovuladas com rFSH ($7,20 \pm 1,27$) em comparação com FSHp ($4,03 \pm 1,62$). Os dados obtidos no referido estudo com rFSH são similares aos compilados pela empresa, considerando mais de 900 coletas de embriões das raças Angus, Brangus e Braford, realizadas nos anos de 2020 e 2021. Nesse levantamento, observou-se que as duas formulações comerciais de FSHp disponíveis comercialmente na época possibilitaram a obtenção de 6 a 7 embriões viáveis por SOV (incluindo as vacas que não responderam ao tratamento). Embora os dados de rFSH sejam promissores, é pouco provável que essa molécula esteja disponível em produtos comerciais a



curto prazo.

No presente momento, entende-se que o maior desafio para a produção *in vivo* de embriões está relacionado ao elevado custo e ao risco de ter flutuações na oferta comercial de FSHp. Portanto, novas formulações de FSHp ou rFSH, bem como estratégias para redução das doses e manejos, serão cruciais para a viabilidade econômica da técnica, especialmente para raças taurinas. Apesar da marcada variação na população folicular entre raças taurinas e sintéticas, a diferença entre raças na produção de embriões *in vivo* é discreta, em comparação com a discrepância observada na produção *in vitro*, que será demonstrada posteriormente. Para ilustrar os dados obtidos na rotina de SOV serão utilizados dados das raças Angus e Brangus, que correspondem à maior parte dos procedimentos realizados pela empresa. Para a raça Angus, são obtidas, em média, $10,49 \pm 0,2$ estruturas totais e $6,29 \pm 0,4$ embriões transferíveis (n=1409 coletas), enquanto para Brangus são obtidas $13,16 \pm 0,43$ estruturas e $7,89 \pm 0,31$ embriões transferíveis (n=595 coletas) por SOV.

Produção *in vitro* de embriões

Na rotina dos autores, a PIV tem sido utilizada principalmente para raças sintéticas, compostas por cruzamentos de raças taurinas e zebuínas, e para a raça Holandês. A PIV é mais viável nesses casos, pois raças sintéticas como Brangus e Braford, têm maior população folicular aspirável, graças ao cruzamento com zebuínos. Para ilustrar as diferenças no número de estruturas recuperadas em cada sessão de OPU, na raça Angus (n=146), foram obtidos $15,9 \pm 0,6$ complexos cumulus ovócito (CCOs), com $10,9 \pm 0,5$ CCOs viáveis, repercutindo, em média, na produção de $3,89 \pm 0,2$ embriões totais por OPU. Já na raça Brangus (n=611), foram obtidos $32,51 \pm 0,8$ CCOs, com $23,8 \pm 0,7$ CCOs viáveis, repercutindo em $7,8 \pm 0,2$ embriões por OPU. Gimenes *et al.* (2015) observaram marcada diferença entre vacas *Bos indicus* e *Bos taurus* na média de CCOs totais ($35,2 \pm 4,8$ vs. $13,8 \pm 1,8$) e CCOs viáveis ($24,7 \pm 3,5$ vs. $7,1 \pm 1,1$). Portanto, pode-se observar que a raça Brangus apresenta características mais próximas à de raças zebuínas (>30 estruturas obtidas por OPU), apesar da predominância genética da raça Angus em sua composição (3/8 zebuína e 5/8 taurina).

Ressalta-se que o número de embriões obtidos *in vivo* ou *in vitro* são similares para a raça Brangus, enquanto para Angus são obtidos, aproximadamente, dois embriões a menos em cada sessão de OPU em comparação com uma SOV. Além disso, a menor criotolerância dos embriões PIV prejudica a viabilidade da técnica para raças de corte taurinas.

No caso do Holandês, embora tenha baixo número de folículos aspiráveis, a possibilidade de otimizar o uso de sêmen sexado de elevado valor, representa uma importante vantagem da PIV. Na SOV são utilizadas três doses de sêmen sexado por doadora a cada coleta, obtendo-se em média $5,4 \pm 0,5$ embriões (n=118), enquanto na PIV é possível utilizar uma dose para fecundar centenas de ovócitos produzindo-se, em média $3,6 \pm 0,1$ embriões por procedimento de OPU (n=343).

Embora o tratamento prévio com FSHp seja utilizado na rotina comercial no Canadá e Europa (Viana, 2022), o aumento no número de folículos e qualidade dos CCOs obtidos em cada OPU é questionável nas condições brasileiras, onde predominam as raças zebuínas. Na rotina dos autores, as OPU são realizadas sem estimulação por tratamento hormonal, o que representa uma economia em relação à SOV para embriões PIV, e redução do número de manejos. Com base no exposto, alternativas que contornem o elevado custo e a variação na disponibilidade de FSHp também poderão beneficiar a PIV de embriões de raças taurinas e sintéticas.

Recentemente, como alternativa ao tratamento com FSHp, nosso grupo avaliou a viabilidade da indução de nova onda folicular para aumentar o número e qualidade das estruturas aspiradas em vacas *Bos taurus* (dados não publicados). A sincronização consistiu na aplicação benzoato de estradiol (2 mg), D-cloprostenol (150 µg) e progesterona injetável de longa ação (300 mg) o que, teoricamente, induziria uma nova onda de crescimento folicular, mantendo os níveis de P4 sérica. Entretanto, a P4 sérica se encontrava em níveis basais no dia da OPU e não foi observado efeito sobre o número de CCOs obtidos (14/OPU), nem sobre a taxa de desenvolvimento embrionário, determinando que as OPU continuassem sendo realizadas sem tratamento hormonal prévio.

Apesar das vantagens da PIV, e da evolução dos protocolos e dos meios de cultivo, a criopreservação dos embriões para transferência direta (*direct transfer* - DT) ainda é menos eficiente, quando comparada com embriões produzidos *in vivo*. Além disso, na visão dos autores, ainda são necessários estudos avaliando as diferenças nas perdas gestacionais e nas características dos neonatos oriundos de embriões produzidos pelas diferentes técnicas, sejam criopreservados ou transferidos a fresco.



Considerações finais

A produção *in vivo* de embriões está muito consolidada, possibilitando resultados consistentes, com relativa pouca variação entre raças. Por outro lado, a PIV tem possibilitado resultados satisfatórios nas raças zebuínas e sintéticas, sendo necessárias pesquisas para aumentar a viabilidade da técnica para raças taurinas. Além disso, pontos cruciais como a criotolerância, variabilidade de resultados, perdas gestacionais e viabilidade dos neonatos devem ser mais estudados para tornar a PIV cada vez mais rentável. Na situação atual, entende-se que a utilização simultânea das duas técnicas ainda é necessária na rotina da produção de embriões de raças taurinas e sintéticas. Sempre devem ser consideradas as marcadas diferenças entre raças, as categorias trabalhadas (novilha, vaca seca, vaca lactante), a variação individual na resposta, as características do sêmen utilizado, a estrutura da propriedade, entre outras particularidades que podem influenciar na escolha da melhor abordagem.

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

- Baracaldo MI, Martínez MF, Adams GP, Mapletoft RJ.** Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology*, v.53, n.6, p.1239-50, 2000.
- 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, 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, Dohlman T.** Effects of endogenous progesterone during ovarian follicle superstimulation on embryo quality and quantity in beef cows. *Theriogenology*, v.129, p.54-60, 2019.
-