

Impacto da qualidade seminal e dos fatores relativos ao macho na produção *in vitro* de embriões bovinos

Impact of semen quality and other male-related factors on in vitro embryo production in cattle

Marcelo Cunha Xavier^{1,2*}, Maurício Antônio da Silva Peixer², João Henrique Moreira Viana³,
Rosângela Vieira de Andrade¹

¹ Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, 71966-700 Brasil

² Bio Biotecnologia da Reprodução Animal, Brasília, DF, 71735-505 Brasil

³ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 70770-901 Brasil

Resumo

A importância da qualidade do sêmen no processo comercial de produção *in vitro* de embriões (PIVE) é bem conhecida, ainda que não devidamente relatada na literatura. Existe não apenas uma significativa diferença entre touros nas taxas de clivagem e de blastocistos, mas também nas taxas de prenhez subsequentes. Adicionalmente, há evidências de interação entre touro e tecnologia de processamento do sêmen (particularmente na separação de espermatozoides por sexo), entre touro e protocolo de preparação do sêmen para fertilização *in vitro*, e ainda entre touro e doadora. Controlar estes efeitos em uma rotina comercial tem sido um desafio crescente para os laboratórios, particularmente com a alta oferta de novos touros decorrente da recente adoção da seleção genômica. O presente trabalho aborda algumas destas questões, com base na experiência da Bio Biotecnologia da Reprodução Animal nesta área.

Palavras-chave: Espermatozoide, fertilização *in vitro*, touro, sexagem de sêmen.

Abstract

The importance of semen quality in a commercial in vitro embryo production (IVEP) routine is well-known, although underreported in the literature. There is not only a significant difference among sires on cleavage and blastocyst rates, but also on subsequent pregnancy rates. Moreover, there are evidences of interaction between sire and sperm processing technology (particularly in the case of sex-sorted semen), between sire and the protocol for sperm preparation for in vitro fertilization, and between sire and donor. Controlling such effects in a commercial routine has been a growing challenge for the laboratories, especially due to the high turnover of sires caused by the recent adoption of genomic selection in most breeds. The current study discusses some of these aspects, from the perspective of the experience of Bio Biotecnologia da Reprodução Animal in this field.

Keywords: Sperm, in vitro fertilization, sire, sex-sorting semen technology.

Introdução

O efeito da variação de fertilidade entre touros na inseminação artificial (IA) ou na produção *in vivo* de embriões é bem conhecido, e resulta em variações significativas nas taxas de gestação e de perdas embrionárias (Pegorer et al. 2007; Kasimanickam et al. 2008) ou na proporção de estruturas classificadas como não-fertilizadas ou degeneradas (Ortega et al. 2018). Estas diferenças têm sido utilizadas inclusive para a classificação de touros e na composição de índices de fertilidade pelas centrais de sêmen e pelos programas de melhoramento animal.

Na produção *in vitro* de embriões (PIVE) parte desta variação individual pode ser atenuada, por exemplo, pela possibilidade do ajuste da concentração espermática na gota de fecundação em função da motilidade e vigor, ou da seleção de espermatozoides viáveis por técnicas como o *swim-up*. Ainda assim, o fator touro é uma importante fonte de variação nos resultados da PIVE (Hansen et al. 2010). Touros com baixo escore de fertilidade na IA também produzem menos blastocistos na PIVE, mesmo após o ajuste da dose inseminante (Ortega et al. 2018). Da mesma forma, observou-se correlação significativa entre as taxas de blastocisto na PIVE e de não retorno na IA (Ward et al. 2001). As diferenças na PIVE entre touros estão associadas a variações na taxa de penetração dos oócitos, na cinética da clivagem e na dose fecundante necessária, e resultam em diferenças não apenas nas taxas de blastocisto mas também na criotolerância dos

*Correspondência: mauricio@biotecnologiaanimal.com.br

Recebido: 08 de maio de 2023

Aceito: 17 de maio de 2023

embriões produzidos e nas taxas de gestação subsequente (Ward et al. 2002, 2003; Wilson et al. 2005; Xu et al. 2006).

Ainda que o efeito touro na PIVE seja descrito na literatura, por limitações naturais de custo e escala, a maioria dos trabalhos utilizou um número pequeno de touros, frequentemente baseando-se na caracterização fenotípica prévia da fertilidade na IA para estabelecer contrastes (i.e., alta vs. baixa fertilidade). Desta forma, existe pouca informação sobre a magnitude (e consequente relevância) das diferenças individuais entre touros em rotinas comerciais de PIVE, nas quais são utilizados centenas de touros, vários dos quais recém-lançados e consequentemente com pouca informação prévia quanto à fertilidade na IA. Adicionalmente, os laboratórios têm o desafio de trabalhar com sêmen processado por centrais diferentes, produzidos por técnicas diferentes (incluindo sexagem e sexagem reversa), e com acasalamentos cuja escolha é definida sem necessariamente considerar ou priorizar o quesito fertilidade.

A Bio Biotecnologia da Reprodução Animal é uma empresa com mais de 20 anos de atuação em reprodução animal, tendo sido uma das pioneiras no uso comercial da PIVE no Brasil. Desta forma, a empresa atuou durante os diferentes períodos que caracterizaram o mercado de embriões nas últimas duas décadas, incluindo os ciclos de expansão da PIVE em raças de corte entre 2000 e 2006, em raças leiteiras entre 2007 e 2014 (fortemente associado ao uso de sêmen sexado), e mais recentemente na produção em larga escala de cruzamentos industriais (Viana et al. 2017, Viana 2022). A base de dados acumulada permite analisar o efeito macho na PIVE, na perspectiva do uso em escala comercial, o que pode contribuir para preencher algumas lacunas existentes na literatura sobre o tema.

O efeito touro na PIVE em escala comercial

Para caracterizar a magnitude do efeito macho na PIVE, avaliou-se dados de 1.062 baterias realizadas na empresa Bio Biotecnologia entre 2003 e 2023 com touros diferentes. Para evitar vícios decorrentes da característica binomial das variáveis expressas em taxas (%), foram excluídos dados de touros utilizados na fecundação de menos de 100 oócitos, sendo efetivamente considerados dados de 542 touros. Todas as baterias de PIVE consideradas utilizaram oócitos (639.824) coletados por aspiração (OPU), e sêmen convencional (não-sexado). A representação gráfica dos resultados está na Figura 1. É possível observar a grande dispersão nos resultados, com taxas variado de 0,9 a 72,9%. Ainda que parte desta variação seja decorrente de diferenças de qualidade dos oócitos utilizados, assim como de efeitos diversos como época do ano, fazenda, meio de cultivo utilizado, etc., o universo amostral utilizado evidencia a importância do sêmen no resultado final, particularmente considerando-se os extremos da curva. De fato, ao se analisar os resultados por quartis, definidos em função da taxa de blastocistos obtida, observa-se que tanto no quartil superior quanto no inferior existem touros que foram utilizados na fecundação de mais de 1000 oócitos, ou seja, envolvendo o acasalamento de várias doadoras, frequentemente em diferentes propriedades, casualizando, portanto, as demais fontes de variação.

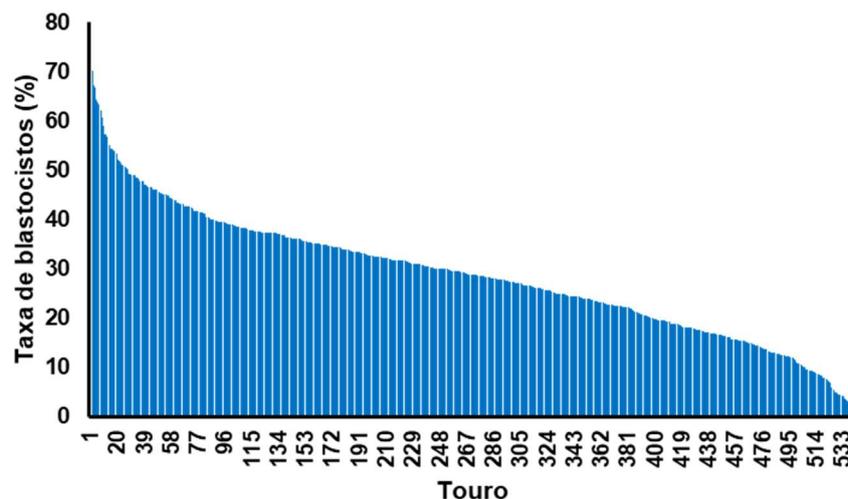


Figura 1. Variação na taxa de blastocistos na PIVE em função do touro utilizado na fecundação, entre os anos de 2003 e 2023 na empresa Bio Biotecnologia.

Na análise da distribuição por quartis também é possível observar que as diferenças observadas nas taxas de blastocistos não ocorreram nas taxas de gestação ou de nascimentos (excluídas as perdas embrionárias e abortos) subsequentes (Tabela 1), e eventuais diferenças observadas entre quartis para estas características parecem estar associadas a outros fatores. De fato, observou-se correlação baixa e não significativa entre as taxas de produção de blastocistos e as taxas de gestação ($R=0,0577$; $P=0,2010$) e de nascimentos ($R=0,05672$; $P=0,2096$). Esta baixa associação sugere que nos touros, assim como observado para doadoras de oócitos, o fenótipo associado à alta produção de embriões pode ser distinto do fenótipo associado à taxa de gestação ou de nascimentos. Estes resultados corroboram os achados de Xu et al. (2006), que não observaram diferenças nas taxas de gestação pós-transferência utilizando sêmen convencional ou sexado, apesar da diferença significativa nas taxas de blastocisto durante a PIVE.

Tabela 1. Estratificação em quartis dos resultados da PIVE e transferência de embriões (TE) por touro, de acordo com a taxa de produção de blastocistos

Quartil	Taxa (%)		
	Blastocistos	Gestação	Nascimento
1	44,9±0,7 ^a	36,8±0,9 ^a	35,3±0,9 ^a
2	32,6±0,2 ^b	33,6±1,1 ^{ab}	31,4±1,1 ^{ab}
3	24,8±0,2 ^c	32,3±1,2 ^b	30,5±1,2 ^b
4	13,2±0,4 ^d	35,4±1,5 ^{ab}	33,9±1,5 ^{ab}
Valor de P	<0,0001	0,0452	0,0199

a,b,c,d Médias distintas, na mesma coluna, diferem ($P<0,05$)

A grande variação individual entre touros também pode ser constatada em situações específicas, como no caso do sêmen submetido à citometria de fluxo para separação de espermatozoides com cromossomos X ou Y (sêmen sexado), ou do resultado de touros na PIVE em animais pré-púberes, conforme demonstrado na Figura 2. De fato, sabe-se que a sexagem por citometria de fluxo pode ocasionar danos aos espermatozoides (Wilson et al. 2005; Wheeler et al. 2006), contudo o potencial efeito deletério varia em função do touro. Dados da Bio Biotecnologia com baterias de PIVE realizadas na mesma época com partidas de sêmen convencional ou sexado dos mesmos touros incluem indivíduos nos quais a sexagem foi associada à queda de 9,5 pontos percentuais nas taxas de blastocisto (35,1% vs. 25,5%), e outros nos quais praticamente não houve diferença numérica (40,6% vs. 40,5%).

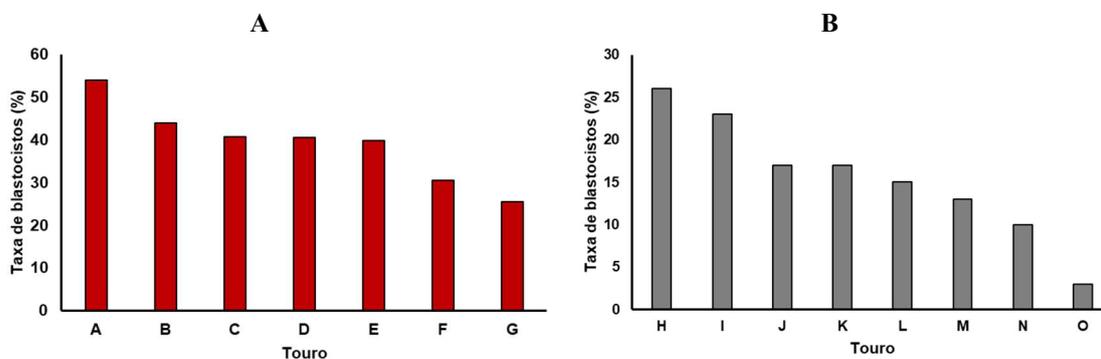


Figura 2. Exemplo da variação individual de touros na PIVE. A) efeito na taxa de blastocistos com o uso de sêmen sexado; B) efeito taxa de blastocistos obtida utilizando-se oócitos obtidos de fêmeas bovinas pré-púberes com uso de sêmen convencional. Dados da empresa Bio Biotecnologia.

Ajuste de protocolos para reduzir o efeito touro

O método de preparo do sêmen é outra fonte importante de variação na PIVE (Machado et al. 2009). Nesse sentido, a Bio Biotecnologia realiza ajustes nos protocolos de processamento de sêmen previamente à FIV. Um exemplo foi o aumento na concentração de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA-FAF, de 4 para 6 mg/mL) utilizada no meio de fecundação, e a redução na velocidade de centrifugação utilizada na separação dos espermatozoides em gradiente de Percoll (de 300 g para 200 g por 8 min). O efeito dessa mudança sobre as taxas de blastocisto está demonstrado na Figura 3. De maneira geral, observa-se que quanto pior o resultado inicial, maior é o ganho com a adequação de protocolo,

demonstrando a importância do ajuste dos procedimentos em função do touro utilizado.

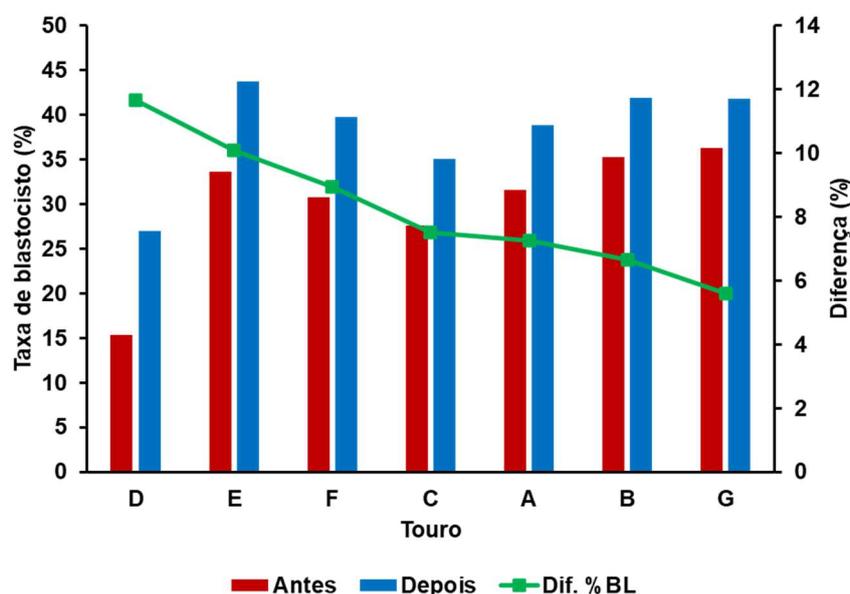


Figura 3. Taxa de produção *in vitro* de blastocistos em função do touro utilizado (A-G), antes (barra vermelha) e após (barra azul) o ajuste do protocolo de preparação do sêmen sexado. A diferença (%) entre a produção antes e após está demonstrada pela linha verde.

Contudo, é importante ressaltar que esse tipo de ajuste ou “customização” de protocolos depende do conhecimento prévio do desempenho dos touros na PIVE. Nesse sentido, a crescente adoção da seleção genômica trouxe um novo desafio para os laboratórios, seja pelo uso de touros cada vez mais jovens – com frequente impacto negativo na qualidade do sêmen comercializado – seja pela dinâmica do mercado. Dependendo da raça, observa-se uma renovação quase completa dos touros em catálogo de um ano para o outro. Consequentemente, os laboratórios têm cada vez menos tempo para testes e ajustes de protocolo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a todas as fazendas colaboradoras, assim como às instituições de ensino e pesquisa parceiros, que possibilitaram a construção e análise dos dados apresentados.

Referências

- Hansen PJ, Block J, Loureiro B, Bonilla L, Hendricks KE.** Effects of gamete source and culture conditions on the competence of *in vitro*-produced embryos for post-transfer survival in cattle. *Reprod Fertil Dev*, v.22, p.59-66, 2010. doi: 10.1071/RD09212.
- Kasimanickam R, Hall JB, Currin JF, Whittier WD.** Sire effect on the pregnancy outcome in beef cows synchronized with progesterone based Ovsynch and CO-Synch protocols. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.1-8, 2008. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.01.003.
- Machado GM, Carvalho JO, Filho ES, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, Dode MA.** Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*, v.71, p.1289-97, 2009. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.01.002.
- Ortega MS, Moraes JGN, Patterson DJ, Smith MF, Behura SK, Poock S, Spencer TE.** Influences of sire conception rate on pregnancy establishment in dairy cattle. *Biol Reprod*, v.99, p.1244-1254, 2018. doi: 10.1093/biolre/iocy141.
- Pegorer MF, Vasconcelos JL, Trinca LA, Hansen PJ, Barros CM.** Influence of sire and sire breed (Gyr versus Holstein) on establishment of pregnancy and embryonic loss in lactating Holstein cows during summer heat stress. *Theriogenology*, v.67, p.692-7, 2007. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.042.
- Viana JH.** Estatísticas da produção e transferência de embriões em 2021: o mercado brasileiro e as

tendências mundiais. *Jornal o Embrião*, v.70, p.9-14, 2022.

Viana JHM, Figueiredo ACS, Siqueira LGB. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. *Anim Reprod*, v.14, p.476-481, 2017.

Xu J, Guo Z, Su L, Nedambale TL, Zhang J, Schenk J, Moreno JF, Dinnyés A, Ji W, Tian XC, Yang X, Du F. Developmental potential of vitrified holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. *J Dairy Sci*, v.89, p.2510-8, 2006. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72326-8.

Ward F, Rizos D, Corridan D, Quinn K, Boland M, Lonergan P. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Mol Reprod Dev*, v.60, p.47-55, 2001. doi: 10.1002/mrd.1060.

Ward F, Enright B, Rizos D, Boland M, Lonergan P. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*, v.57, p.2105-17, 2002. doi: 10.1016/s0093-691x(02)00696-9.

Ward F, Rizos D, Boland MP, Lonergan P. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. *Theriogenology*, v.59, p.1575-84, 2003. doi: 10.1016/s0093-691x(02)01202-5.

Wheeler MB, Rutledge JJ, Fischer-Brown A, VanEtten T, Malusky S, Beebe DJ. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology*, v.65, p.219-227, 2006. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.032.

Wilson RD, Weigel KA, Fricke PM, Rutledge JJ, Leibfried-Rutledge ML, Matthews DL, Schutzkus VR. *In vitro* production of Holstein embryos using sex-sorted sperm and oocytes from selected cull cows. *J. Dairy Sci.*, v.88, p.776-782, 2005.
