

## PRODUÇÃO COMERCIAL DE EMBRIÕES *IN VIVO* – UM ESTUDO RETROSPECTIVO

RUDINEI KLAHN MUNIZ JÚNIOR<sup>1</sup>; WAGNER MARQUES DE LIMA<sup>2</sup>; MONIQUE MAZZAROLLO FRATA<sup>3</sup>; FABIANE PEREIRA DE MORAES<sup>4</sup>; BERNARDO GARZIERA GASPERIN<sup>5</sup>; RAFAEL GIANELLA MONDADORI<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas- [rudinei.kmuniz@gmail.com](mailto:rudinei.kmuniz@gmail.com)

<sup>2</sup>Biotec Biotecnologia- [wagner@biotec.vet.br](mailto:wagner@biotec.vet.br)

<sup>3</sup>Biotec Biotecnologia; Universidade Federal de Pelotas- [moniquefrata@hotmail.com](mailto:moniquefrata@hotmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas- [fabypmoraes@gmail.com](mailto:fabypmoraes@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas- [bggasperin@gmail.com](mailto:bggasperin@gmail.com)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas- [rgmondadori@gmail.com](mailto:rgmondadori@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

Atualmente a multiplicação de vacas com características genéticas de interesse pode ser realizada através da produção de embriões *in vivo* e *in vitro*. A produção *in vivo* de embriões foi iniciada na década de 1940, quando pela primeira vez houve uma superovulação em bovinos bem-sucedida (DZIUK et al 1958) e vem sendo utilizada desde então em mundialmente. Essa técnica consiste em um protocolo hormonal que manipula o ciclo estral da fêmea bovina, fazendo com que ocorra múltiplas ovulações (superovulação-SOV) e com a realização de inseminações em momentos pré-definidos, ocorra o desenvolvimento de diversos embriões. Esses embriões são coletados da doadora por meio de uma lavagem uterina e podem ser criopreservados ou transferidos em receptoras com seu ciclo estral sincronizado para receber os embriões (VIEIRA et al, 2021).

Dada a importância da difusão genética através do uso de embriões, no ano de 2022 a Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS) divulgou que 394.504 embriões foram produzidos no mundo por meio da SOV. Em contraste, no mesmo relatório foi divulgado que a produção *in vitro* de embriões (PIVE) foi de 1.595.204, realizado por meio da aspiração folicular (VIANA, 2023).

Tanto a produção de embriões *in vivo* quanto *in vitro* são métodos eficientes para a multiplicação genética, mas as particularidades das fêmeas que serão submetidas a técnica devem ser levadas em conta. Fêmeas zebuínas (*Bos indicus*) possuem uma população de folículos antrais maiores que as taurinas (*Bos taurus*) (CARVALHO et al., 2007) apresentando um maior número de estruturas para a aspiração folicular e fertilização *in vitro*. Desta forma, as fêmeas taurinas apresentam resultados médio de 5 a 7 embriões recuperados por SOV (HASLER, 2012), visto que necessitam de um estímulo hormonal para um maior desenvolvimento folicular. Assim, a produção de embriões *in vivo* se mostra uma alternativa para a cadeia produtiva do sul do Brasil, visto que é uma região tradicionalmente criadora de gado taurino (BATISTA FILHO, 2016).

No entanto, a produção de embriões *in vivo* possui alguns desafios para sua realização, como por exemplo: a variabilidade da resposta da fêmea à SOV, estresse térmico, fatores nutricionais e o custo do protocolo hormonal. Outro fator que pode influenciar nos resultados da SOV é o grupamento genético que os animais fazem parte (MIKKOLA et al., 2019).

Portanto, este relato tem por objetivo analisar os resultados de produção *in vivo* de embriões obtidos na rotina comercial de uma empresa sediada no Rio Grande do Sul.

## 2. METODOLOGIA

Foram analisados dados de 2605 coletas de embriões de fêmeas bovinas púberes *Bos taurus*, *Bos indicus* e sintéticas, de diferentes idades, alojadas em propriedades nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina. As doadoras foram pré-sincronizadas mediante a aplicação de 2 mg de Benzoato de estradiol e inserção de um dispositivo contendo 1 g de P4 por 8 dias. Ao final deste período, foi administrado 150 µg de D-Cloprostenol, considerando a ocorrência de estro 48 h após. No intervalo entre 8 e 10 dias após o estro, foi realizada uma avaliação ginecológica (D0) a fim de detectar a presença de um corpo lúteo (CL) e para a ablação de folículos > 8 mm. No dia seguinte (D1), foi iniciada a superovulação estro-base (SOV/EB) com a aplicação de oito doses decrescentes de FSH, em intervalos de 12 h. As dosagens de FSH variaram de acordo com a raça e qualidade da resposta a tratamentos anteriores. Juntamente com a sexta e sétima dose de FSH, foi administrado 150µg de D-Cloprostenol para induzir a luteólise. Os animais foram observados para detecção do início do estro, momento em que foi aplicado 50µg de Lecirelina, análogo de GnRH para melhor sincronização das ovulações. Às 12 e 24 horas após a aplicação do GnRH foram realizadas as IA (D5), seguindo os acasalamentos propostos pelos programas de melhoramento de cada cliente.

A coleta dos embriões foi realizada seis dias após a segunda IA (D12), onde as vacas contidas em tronco apropriado, receberam anestesia epidural com 5 ml de lidocaína 2%, higienização da região vulvar e, por meio de um cateter de Folley foi realizada a lavagem do corpo e cornos uterinos simultaneamente, usando 1 L de solução de DMPBS que foi passado em filtro específico visando a retenção das estruturas coletadas. O conteúdo do filtro foi então depositado em placa de Petri, para a busca, lavagem e classificação das estruturas. Neste momento foram registrados dados referentes ao número total de estruturas coletadas que foram classificadas em degenerados, não fecundados e embriões transferíveis. Foram considerados embriões de grau 1 e 2, segundo International Embryo Technology Society (IETS). Os embriões foram então criopreservados ou transferidos para receptoras que tiveram seu ciclo estral previamente sincronizado.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 2605 coletas de embriões foram realizadas em vacas de diferentes raças. 1409 animais da raça Angus (AA), 87 animais Hereford (HP), 158 animais Charolês (CH), 46 animais Devon (DE), 118 animais Holandês (HO), 586 animais Brangus (BN), 187 animais Braford (BO) e 14 animais Nelore (NE). Assim sendo, 69,7% dos animais eram de raça taurina (Angus, Hereford, Charolês, Devon, Holandês), 29,6% de raça sintética (Brangus e Braford) e 0,53% de raça zebuína (Nelore). Esses percentuais representam de forma fidedigna a região em que este relato foi desenvolvido, visto que em função do clima da região sul, existe uma prevalência maior das raças taurinas (BATISTA FILHO, 2016).

O total de estruturas coletadas média ( $\pm$ erro padrão) de cada raça foram: AA: 10,49 ( $\pm$ 0,21), HP: 13,70 ( $\pm$ 0,73), CH: 12,90 ( $\pm$ 0,65), DE: 9,11 ( $\pm$ 1,01), HO: 9,58 ( $\pm$ 0,66), BN: 13,16 ( $\pm$ 0,43), BO: 13,82 ( $\pm$ 0,81) e NE: 18,21 ( $\pm$ 2,26). Ao avaliarmos esses dados por grupamento racial, os animais taurinos obtiveram uma média ( $\pm$ erro padrão) de estruturas recuperadas de 11,15 ( $\pm$ 0,65), os sintéticos uma média de 13,42 ( $\pm$ 0,62) e os zebuínos 18,21 ( $\pm$ 2,26). O número maior de estruturas

recuperadas foi observado na raça Nelore (zebuíno), isso pode ser atribuído à uma maior população folicular característica dos zebuínos (CARVALHO et al., 2007).

A média ( $\pm$ erro padrão) de estruturas degeneradas foi mensurada, resultando nos seguintes valores: AA: 2,26 ( $\pm$ 0,10), HP: 2,44 ( $\pm$ 0,35), CH: 2,96 ( $\pm$ 0,25), DE: 2,07 ( $\pm$ 0,39), HO: 1,28 ( $\pm$ 0,16), BN: 2,76 ( $\pm$ 0,21), BO: 2,27 ( $\pm$ 0,25) e NE: 5,07 ( $\pm$ 1,67). A média ( $\pm$ erro padrão) de embriões degenerados nas fêmeas taurinas foi de 2,20 ( $\pm$ 0,25), das fêmeas de raças sintéticas 2,51 ( $\pm$ 0,23) e nas zebuínas 5,07 ( $\pm$ 1,67). Estruturas degeneradas ou embriões que não se desenvolvem, são perdas bem presentes na rotina da produção de embriões, entretanto existem diversas causas para essas perdas, como: idade da doadora, protocolo hormonal utilizado, nutrição e até mesmo estresse da doadora (MIKKOLA et al., 2019).

A proporção de estruturas não fecundadas por estrutura recuperada também foi avaliada, obtendo uma média ( $\pm$ erro padrão) de: AA: 0,19 ( $\pm$ 0,01), HP: 0,28 ( $\pm$ 0,04), CH: 0,16 ( $\pm$ 0,02), DE: 0,11 ( $\pm$ 0,04), HO: 0,28 ( $\pm$ 0,03), BN: 0,19 ( $\pm$ 0,01), BO: 0,31 ( $\pm$ 0,03) e NE: 0,27 ( $\pm$ 0,10). A média ( $\pm$ erro padrão) estruturas não fecundadas comparadas com o número de estruturas recuperadas nas fêmeas taurinas, sintéticas e zebuínas foi de 0,20 ( $\pm$ 0,02), 0,25 ( $\pm$ 0,02) e 0,27 ( $\pm$ 0,10), respectivamente.

A média ( $\pm$ erro padrão) de embriões graus 1 e 2 produzidos em cada raça foi de: AA: 6,29 ( $\pm$ 0,15), HP: 7,82 ( $\pm$ 0,71), CH: 7,98 ( $\pm$ 0,49), DE: 6,07 ( $\pm$ 0,84), HO: 5,38 ( $\pm$ 0,48), BN: 7,89 ( $\pm$ 0,31), BO: 6,84 ( $\pm$ 0,55) e NE: 9,93 ( $\pm$ 2,33). A média ( $\pm$ desvio padrão) de embriões produzidos em fêmeas taurinas foi de 6,70 ( $\pm$ 0,53), nas de raça sintética foi 7,36 ( $\pm$ 0,43) e nas zebuínas 9,93 ( $\pm$ 2,33). O maior número de embriões produzidos por animais da raça zebuína pode ser explicado por um maior número de folículos antrais, estudos relacionaram essa característica com um melhor desempenho para produção de embriões *in vivo* e *in vitro* (SILVA SANTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2016). Além disso, essa característica tem uma alta repetibilidade em um mesmo indivíduo (IRELAND et al., 2007), podendo ser um indicador do potencial desse indivíduo para essa técnica.

Por fim, o último tópico mensurado foi a proporção de embriões graus 1 e 2 comparado com o número de estruturas recuperadas. A média ( $\pm$ erro padrão) dos animais de cada raça foi: AA: 0,60 ( $\pm$ 0,01), HP: 0,55 ( $\pm$ 0,04), CH: 0,61 ( $\pm$ 0,02), DE: 0,66 ( $\pm$ 0,05), HO: 0,58 ( $\pm$ 0,03), BN: 0,63 ( $\pm$ 0,01), BO: 0,51 ( $\pm$ 0,03) e NE: 0,48 ( $\pm$ 0,09). O resultado médio das fêmeas taurinas foi de 0,60 ( $\pm$ 0,03), as fêmeas sintéticas atingiram uma média de 0,57 ( $\pm$ 0,02) e as zebuínas de 0,48 ( $\pm$ 0,09).

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados abordados no presente relato demonstram que a média de estruturas totais coletadas foi de 12,62 ( $\pm$ 0,84) sendo que na média, cada procedimento de SOV gerou 7,27 ( $\pm$ 0,73) embriões graus 1 e 2.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA FILHO, M. NASCIMENTO, VA. DIAS, M. Evolução do efetivo de bovinos no Brasil, estado de Goiás e município de Jataí (GO). **Enciclopedia Biosfera**, Goiânia, v. 13, n. 23, p. 610-624, 2016.

CARVALHO JBP, CARVALHO, NAT. REIS, EL. NICHI, M. SOUZA, AH. BARUSELLI PS. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols

in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, 2007.

DZIUK, PJ, DONKER, FD, NICHOLS, JP e PETERSEN, JE. Problemas associados à transferência de óvulos entre bovinos. **Boletim Técnico 222**, Estação Experimental Agrícola da Universidade de Minnesota. 1958.

FISCHDICK, RO. RODRIGUES, CFM. DE PINHO, TG. BRANDÃO, FZ. CAVALCANTI, AS. BOITÉ, MC. NOGUEIRA, LA. Comparative technics of follicular wave emergence synchronization in the cattle superovulation. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niteroi, v. 16, n. 3, p. 119-123, 2009.

HASLER, JF. Bovine Embryo Transfer: Are Efficiencies Improving? Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle. **ResearchGate**, Sioux Falls, SD, 2012.

IRELAND, JJ. WARD, F. JIMENEZ-KRASSEL, F. IRELAND, JLH. SMITH, GW. LONERGAN, P. EVANS, ACO. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Human Reproduction**, v.22, p.1687-1695, 2007.

MIKKOLA, M. HASLER, JF. TAPONEN, J. Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, Australia, v.32, n.2, p.104-124, 2019.

SANTOS, G.M.G.; SILVA-SANTOS, K.C.; BARREIROS, T.R.R.; MOROTTI, F.; SANCHES, B.V.; MORAES, F.L.Z.; BLASCHIB, W.; SENEDA, M.M. High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. **Animal Reproduction Science**, v.165, p.17-21, 2016.

SILVA-SANTOS, KC. SANTOS, GMG. KOETZ JUNIOR, C. MOROTTI, F. SILOTO, LS. MARCANTONIO, TN. URBANO, MR. OLIVEIRA, RL. LIMA, DCM. SENEDA, MM. Antral Follicle Populations and Embryo Production – In Vitro and In Vivo – of *Bos indicus*–*taurus* Donors from Weaning to Yearling Ages. **Reproduction in Domestic Animal**. 49, 228–232, 2014.

STEINHAUSER, CB. LOONEY, CR. HASLER, JF. RENAUD, P. Análise retrospectiva da superestimulação com Follitropin-V em Wagyu versus outras raças de corte. **Animal Reproduction**, Minas Gerais, 15, 553, 2018.

VIANA, HM. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, Champaign, v.40, n.4, p.22-40, 2023.

VIEIRA, AD. Tecnologia de embriões bovinos produzidos *in vivo*. In: DIAS, PB.; FIGUEIREDO, JR.; GASPERIN, BG. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal e à humana**. Rio de Janeiro: Editora ROCA, 2021. Cap. 12, p. 214 – 232.

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.