

## VARIAÇÕES ENTRE TOUROS, DOADORAS E SUA INTERAÇÃO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES E TAXA DE PRENHES DA RAÇA BRAHMAN NO BRASIL

Daniel C Joaquim<sup>1</sup>, Silvia H Dias <sup>1</sup>, Ione Castro <sup>2</sup>, Dorival Cavalheiro <sup>3</sup>, Michele R Watanabe<sup>1</sup>, André Dayan<sup>1</sup>, Yeda F Watanabe<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Vitrogen®, Cravinhos/SP [yeda@vitrogen.com.br](mailto:yeda@vitrogen.com.br);

<sup>2</sup> Vitrogen®, Campo Grande/MS

<sup>3</sup> Vitrogen®, Uberaba/MG

**Resumo:** Vários fatores influenciam a eficiência nos procedimentos de OPU-PIV, entre eles a variação individual. O objetivo do trabalho foi avaliar a variação entre as doadoras, os touros e sua interação na produção *in vitro* de embriões e taxa de prenhez. Para tanto, foram analisadas 15 doadoras, onde a produção média de oócitos foi de 29,3 com variação de 16,1 a 59,4 por doadora/OPU. A produção média de blastocisto foi de 37% (variação de 17 a 57%) e prenhez 38% (variação de 26 a 50%). No estudo de 15 touros a taxa de embriões foi de 32% (variação de 9 a 46%) e de prenhez de 32% (variação de 19 a 50%). No entanto, quando analisamos a interação doadora x touro, vimos que esta variação é muito maior, tanto para a produção de embriões (de 9 a 77%) quanto na taxa de prenhez (variação de 8 a 61%). Deste modo, conclui-se que o fator interação doadora x touro na produção *in vitro* de embriões leva a uma maior eficiência no processo de OPU-FIV chegando a índices satisfatórios de prenhez por sessão de aspiração (média de 48,0 e 23,0 para blastocistos e prenhez, respectivamente). Desta forma recomenda-se um estudo prévio dos dados de acasalamento para melhorar os índices no processo de OPU-FIV levando a um aumento do ganho genético na raça Brahman.

**Palavras-chave:** Acasalamento, Brahman, OPU-FIV, variação individual

**Abstract:** Many factors affect the efficiency of procedures of OPU-IVP, including individual variation. The objective was to evaluate the variation between donors, the bulls and their interaction *in vitro* production of embryos and pregnancy rate. To this end, 15 donors were analyzed, where the average production of oocytes was 29.3 ranging from 16.1 to 59.4 per donor/OPU. The average blastocyst was 37% (range 17 to 57%) and pregnancy 38% (range 26 to 50%). In the study of the 15 bulls the rate of embryos was 32% (range 9-46%) and pregnancy was 32% (range 19-50%). However, when analyzing the interaction between donor bull x donors, we have seen that this variation is much greater, both for the production of embryos (9-77%) and pregnancy rates (range 8-61%). Thus, we conclude that the interaction factor bull x donor on *in vitro* production of embryos leads to greater efficiency in the process of OPU-IVF reaching satisfactory levels of pregnancy by aspiration session (average of 48 and 23 to blastocyst and pregnancy, respectively). Thus it is recommended that a preliminary study of data from breeding to improve the indices of the OPU-IVF process leading to an increase in genetic gain in the Brahman breed.

**Keywords:** Mating, Brahman, OPU-IVF, individual variation

### Introdução

A fecundação *in vitro* é considerada a terceira geração de biotecnologia da reprodução, após a Inseminação Artificial e a Transferência de Embriões. Desde o nascimento do primeiro bezerro oriundo da fecundação *in vitro* (Bracket *et al*, 1982), os processos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* foram melhorados consideravelmente onde, atualmente, a técnica é considerada viável em programas de melhoramento genético animal, uma vez diminui o intervalo entre gerações acelerando o ganho genético.

A aplicação prática da produção *in vitro* de embriões depende, principalmente, da quantidade e qualidade de oócitos que pode ser colhido das vacas geneticamente superiores. Tendo em vista que oócitos imaturos podem ser colhidos *in vivo*, repetitivamente de um mesmo

animal por vários meses, a associação OPU/FIV (*ovum pick-up* e fecundação *in vitro*) tem grande potencial de aplicação (Gibbons, 1994).

Baseado no número médio de oócitos colhidos por sessão, é possível transferir 5 a 8 embriões/semana/doadora, resultando em 2 a 3 bezeros. Comparada com a produção *in vivo* de embriões mediante indução de múltiplas ovulações e transferência de embriões, a fecundação *in vitro* via punção folicular de vacas vivas, é capaz de produzir pelo menos 3 vezes mais embriões (Dayan *et al* 1999, Ferraz *et al* 2000). E para incrementar mais ainda esta produção comercial de embriões bovinos vários trabalhos foram desenvolvidos onde estudou a variação individual dos animais nos processos de fecundação *in vitro* (Watanabe *et al*, 1998, Dayan 2002, Watanabe 2002, Watanabe *et al*, 2008).

O objetivo desse estudo foi apresentar as variações entre doadoras, touros e sua interação na produção *in vitro* de blastocistos e na taxa de prenhez na raça Brahman de um laboratório comercial de OPU-FIV do grupo Vitrogen no Brasil.

### **Metodologia**

Os embriões foram produzidos *in vitro* de acordo com o protocolo descrito por Watanabe *et al*, 1998. Os oócitos viáveis foram obtidos por aspiração folicular transvaginal de várias doadoras, os quais foram maturados por 24 horas, seguidos para a fecundação com diferentes touros por 18 horas de incubação. Após este período, os possíveis zigotos foram cultivados *in vitro* por 7 dias e a taxa de blastocistos averiguada. A seguir os embriões foram transferidos para receptoras sincronizadas e a detecção da prenhez foi realizada mediante ultra-sonografia entre 30 e 35 dias após a transferência e re-confirmada aos 60 dias.

Foi analisada a produção de 15 doadoras acasaladas com diferentes reprodutores. Para o estudo da variação entre touros, também se utilizou dados de 15 touros acasalados com várias doadoras em diferentes sessões de aspiração. Os mesmos animais foram utilizados no estudo da interação doadora x touro da raça Brahman nas unidades da Vitrogen® Brasil.

### **Resultados e Discussão**

A variabilidade entre doadoras de oócitos foi muito grande, sendo que os animais respondem diferentemente à aspiração folicular. Na tabela 1 podemos observar que diferentes doadoras apresentaram resultados variáveis tanto na recuperação de oócitos como no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocistos e taxa de prenhez. Podemos observar que a média de oócitos viáveis por doadora foi de 29, variando de 16 a 59 oócitos por doadora/OPU. A taxa média de blastocistos obtida destas doadoras foi de 37% (com variação de 17 a 57%) com prenhez de 38% de média e variação de 26 a 50%. O número médio de embriões produzidos e de prenhez por doadora e sessão de OPU foi de 10,6 e 3,1, respectivamente.

A utilização de sêmen congelado de diferentes touros demonstrou um importante papel no resultado final do processo de OPU-FIV. Na Tabela 2 podemos observar a variação individual de 15 touros acasalados com diferentes doadoras, tanto na taxa de blastocisto (32% de média com variação de 9 a 46%) quanto na de prenhez (média de 32% com variação de 19 a 50%).

Tabela 1. Produção *in vitro* de embriões bovinos a partir de oócitos recuperados de diferentes doadoras (D1 a D15), acasaladas com diferentes touros.

Doad.	N. Touros	OPU	N. Oócitos	N. Blast.	Blast. (%)	N. TE	TE Palp.	Prenhez (%)	Média		
									Oócitos	Blast.	Prenhez
D1	5	11	206	95	46	94	94	35	18,7	8,6	3,0
D2	6	12	225	38	17	38	15	33	18,8	3,2	0,4
D3	4	12	307	176	57	174	107	43	25,6	14,7	3,8
D4	3	10	395	155	39	141	136	44	39,5	15,5	6,0
D5	8	13	262	77	29	71	42	36	20,2	5,9	1,2
D6	13	28	1.086	375	35	368	305	38	38,8	13,4	4,1
D7	8	21	419	145	35	145	77	36	20,0	6,9	1,3
D8	6	17	494	113	23	95	72	46	29,1	6,6	1,9
D9	6	31	761	358	47	320	231	26	24,5	11,5	2,0
D10	5	14	225	69	31	69	44	25	16,1	4,9	0,8
D11	5	11	417	168	40	157	122	50	37,9	15,3	5,5
D12	2	8	370	113	31	113	51	43	46,3	14,1	2,8
D13	6	14	391	178	46	177	130	38	27,9	12,7	3,6
D14	3	14	236	68	29	68	68	35	16,9	4,9	1,7
D15	4	5	297	105	35	105	98	43	59,4	21,0	8,4
<b>Total</b>	<b>84</b>	<b>186</b>	<b>6.091</b>	<b>2.233</b>	<b>37</b>	<b>2.135</b>	<b>1.592</b>	<b>38</b>	<b>29,3</b>	<b>10,6</b>	<b>3,1</b>

Tabela 2. Variação individual de touros na produção *in vitro* de embriões bovinos acasalados com diferentes doadoras.

Touros	N. Doad.	N. OPU	N. Oócitos	N. Blast.	Blast (%)	TE	TE Palp.	N. Prenhez	Prenhez (%)
T1	339	39	8.466	2.636	31	2.618	1.364	481	35
T2	233	27	5.921	2.151	36	2.132	1.437	510	35
T3	61	12	1.438	398	28	371	312	95	30
T4	135	21	2.973	596	20	596	279	104	37
T5	4	1	87	8	9	8	8	4	50
T6	19	5	562	216	38	214	214	73	34
T7	44	11	1.292	218	17	217	134	42	31
T8	218	28	3.916	1.444	37	1.319	1.198	348	29
T9	12	5	196	76	39	76	50	14	28
T10	30	5	635	223	35	196	157	42	27
T11	7	5	133	40	30	38	37	14	38
T12	90	20	1.367	593	43	566	427	79	19
T13	158	33	3.535	1.148	32	1.107	873	266	30
T14	45	13	1.199	548	46	542	340	127	37
T15	19	8	552	160	29	160	158	62	39
<b>Total</b>	<b>1.414</b>	<b>155</b>	<b>32.272</b>	<b>10.455</b>	<b>32</b>	<b>10.160</b>	<b>6.988</b>	<b>2.261</b>	<b>32</b>

Além da variação individual de touros e doadoras, também existe um efeito resultante da interação entre o touro e a doadora, onde uma mesma doadora apresenta variações na produção de embriões e de gestações, quando acasalado com diferentes touros (Tabela 3). Avaliou-se a produção das doadoras acasaladas com diferentes touros, resultando numa taxa de blastocisto de 39%, mas com uma variação muito grande entre os diferentes acasalamentos (variação de 9 a 77%) e a taxa média de prenhez de 35% (variação de 8 a 61%).

Tabela 3. Variação na taxa de blastocisto e prenhez de acordo com o acasalamento utilizado na produção *in vitro* de embriões.

Doad.	Touro	N. OPU	N. Oócitos	N. Blast.	Blast	N. TE	TE Palp.	Prenhez	Média		
									Oócitos	Blast.	Prenhez
D1	T4	2	35	11	31%	11	11	18%	17,5	5,5	1,0
D1	T5	1	22	2	9%	2	2	50%	22,0	2,0	1,0
D1	T6	1	22	17	77%	16	16	31%	22,0	17,0	5,0
D2	T7	6	135	15	11%	15	7	38%	22,5	2,5	0,5
D2	T2	1	22	6	27%	6	6	17%	22,0	6,0	1,0
D3	T1	6	173	109	63%	107	45	47%	28,8	18,2	3,5
D3	T2	4	114	45	39%	45	45	33%	28,5	11,3	3,8
D3	T8	1	17	9	53%	9	9	56%	17,0	9,0	5,0
D4	T1	4	128	57	45%	53	53	40%	32,0	14,3	5,3

D4	T2	5	220	93	42%	83	83	45%	44,0	18,6	7,4
D5	T2	2	35	13	37%	13	13	15%	17,5	6,5	1,0
D5	T10	3	74	40	54%	34	22	50%	24,7	13,3	3,7
D6	T8	3	173	47	27%	47	47	55%	57,7	15,7	8,7
D6	T3	2	108	43	40%	43	43	12%	54,0	21,5	2,5
D6	T10	4	133	47	35%	40	35	26%	33,3	11,8	2,3
D7	T2	4	67	36	54%	36	36	42%	16,8	9,0	3,8
D7	T3	2	43	13	30%	13	13	8%	21,5	6,5	0,5
D7	T10	3	34	12	35%	12	10	20%	11,3	4,0	0,7
D8	T1	3	74	30	41%	26	25	28%	24,7	10,0	2,3
D8	T3	5	151	22	15%	19	17	47%	30,2	4,4	1,6
D8	T4	2	73	7	10%	7	5	40%	36,5	3,5	1,0
D9	T1	4	134	62	46%	62	19	53%	33,5	15,5	2,5
D9	T8	10	300	140	47%	113	92	22%	30,0	14,0	2,0
D9	T11	5	65	23	35%	23	23	39%	13,0	4,6	1,8
D9	T12	5	122	74	61%	69	67	12%	24,4	14,8	1,6
D9	T13	6	122	53	43%	49	49	29%	20,3	8,8	2,3
D10	T2	4	56	31	55%	31	30	10%	14,0	7,8	0,8
D10	T8	3	71	22	31%	22	22	36%	23,7	7,3	2,7
D11	T8	1	43	25	58%	20	20	15%	43,0	25,0	3,0
D11	T3	2	61	30	49%	26	26	38%	30,5	15,0	5,0
D11	T13	3	122	58	48%	56	56	48%	40,7	19,3	9,0
D12	T1	6	328	90	27%	90	28	29%	54,7	15,0	1,3
D12	T14	1	42	23	55%	23	23	61%	42,0	23,0	14,0
D13	T8	6	133	65	49%	64	63	38%	22,2	10,8	4,0
D13	T14	1	46	34	74%	34	15	67%	46,0	34,0	10,0
D13	T15	2	86	31	36%	31	31	26%	43,0	15,5	4,0
D14	T8	3	69	21	30%	21	21	24%	23,0	7,0	1,7
D14	T4	2	33	4	12%	4	4	50%	16,5	2,0	1,0
D14	T13	9	134	43	32%	43	43	40%	14,9	4,8	1,9
D15	T2	1	90	26	29%	26	19	58%	90,0	26,0	11,0
D15	T13	1	90	31	34%	31	31	26%	90,0	31,0	8,0
D15	T6	1	107	48	45%	48	48	48%	107,0	48,0	23,0
<b>Total</b>		<b>140</b>	<b>4107</b>	<b>1608</b>	<b>39%</b>	<b>1523</b>	<b>1273</b>	<b>35%</b>	<b>33,5</b>	<b>13,3</b>	<b>4,1</b>

### Conclusão

Portanto é importante sempre que for trabalhar com aplicação comercial da técnica de FIV, seja criopreservação de embriões ou outras linhas de pesquisa, chegar ao

resultado final que é a taxa de gestação, uma vez que altas taxas de produção *in vitro* de blastocistos não correspondem à melhor qualidade embrionária. Além disso, faz-se necessário um estudo de acasalamentos para aumentar a eficiência da técnica nos programas de melhoramento genético.

#### Agradecimento

Agradecemos a todos os criadores do Brasil por acreditar nesta nova tecnologia. Ao CNPq e à FAPESP pelos financiamentos de projetos de pesquisa. E, em especial a toda a equipe da Vitrogen® pelo trabalho realizado nestes 12 anos.

#### Referências Bibliográficas

- BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L. et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biol. Reprod.**, v.27, p.147-158, 1982.
- DAYAN, A. Fatores que interferem na produção de embriões bovinos mediante aspiração folicular e fecundação *in vitro*. Botucatu, 2001, 56p., dissertação (mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Jaboticabal - Universidade Estadual Paulista
- DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; LÔBO, R.B.; et al. A influência da condição ovariana na aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões em raças zebrúinas. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.27, n.1, p.226, 1999.
- FERRAZ, M.L.; DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; WATANABE, Y.F Influência da frequência de OPU-FIV em bovinos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.28, n.1, p.251, 2000.
- GIBBONS, J.R., BEAL, W.E., KRISHER, R.L., et al. Effects of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocytes recovery and embryo development. **Theriogenology** v.42, p.405 1994.
- PIETERSE M.C, KAPPEN, K.A., KRUIP, A. M. et al. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning ovaries. **Theriogenology**, v.30, p.751-756, 1988.
- WATANABE, M.R Aspiração *in vivo* de oócitos em fêmeas nelore de diferentes idades reprodutivas mediante punção transvaginal guiada por ultra-som. Jaboticabal, 2002, 73p., Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - Universidade Estadual Paulista.
- WATANABE, M.R; LÔBO, R.B; DAYAN, A.; et al. Produção *in vitro* de embriões por sessão de aspiração em fêmeas nelore. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.26, n.1, p.382-383, 1998.
- WATANABE, Y.F A fecundação *in vitro* e reação acrossomal como critério de seleção para fertilidade em touros jovens da raça Nelore. Ribeirão Preto, 1998, 67 p., Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP.
- WATANABE, YF; DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; et al. **Aspecto comercial de embriões bovinos produzidos *in vitro***. Capítulo 15, p. 293-301 Livro: Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. Bayard, et al, 2. Ed. – São Paulo, Roca, 2008.