

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE MINI VACAS

(*In vitro* embryo production of miniature cattle)

Itamar Rodrigues TOLEDO¹; Anderson Victor ARAÚJO¹;
Ana Luiza Silva GUIMARÃES^{2*}

¹Medicina Veterinária CEULP ULBRA, Av. Teotônio Segurado, 1501. CP: 85, Sul Palmas/TO.
CEP: 77.019-900; ²Dpto de Medicina Veterinária, Centro Universitário Luterano
(CEULP ULBRA). *E-mail: ana.guimaraes@ulbra.br

ABSTRACT

With a focus on productivity, Brazil has advanced research and application of reproductive biotechnologies. However, much remains to be explored, such as *in vitro* embryo production and transfer in miniature breeds. Thus, the objective of the present work is to report the *in vitro* production of miniature bovine embryos and transfer to conventional sized cows located in Palmas/TO. Nine miniature Jersey-Holstein cross breed donors were aspirated to obtain approximately 13 viable oocytes per female. The oocytes were matured, fertilized and cultured *in vitro*, where the production of viable embryos was 23.2%. On day 7 of development (D7) the embryos were transferred to 17 crossbred dairy recipients and after 30 days of innervation by ultrasound examination a conception rate of 76.4% was found. Thus, the technique of *in vitro* production and embryo transfer is viable for the reproduction of mini dairy cows, despite the lack of data regarding the work performed on small animals that serve as comparative parameters for the results achieved in the study.

Key words: Bovine, *in vitro* fertilization, reproduction.

INTRODUÇÃO

A agropecuária nacional está cada vez mais focada na produtividade, atualmente os avanços tecnológicos e evoluções científicas são a busca mais incessante deste mercado. Assim, a reprodução animal vem sendo desenvolvida e aprimorada com o intento de melhorar a eficiência reprodutiva, aumentando a produção de animais geneticamente superiores em menor tempo (RENESTO e COELHO, 2004).

Várias biotécnicas foram desenvolvidas no decorrer dos anos, como a produção *in vitro* de embriões (PIVE), sendo progressivamente incorporada nos programas de melhoramento genético animal. Uma das formas de multiplicar um alto mérito genético dentro de um plantel é por meio da aspiração folicular, onde os ovócitos serão submetidos a fecundação *in vitro*, e posteriormente transferidos para fêmeas receptoras (GONÇALVES *et al.*, 2007; NEVES *et al.*, 2010).

Nesse contexto tecnológico, pouco se sabe sobre o emprego de biotécnicas em mini-bovinos. Não é sabido o quantitativo desses animais em território nacional, mas no cenário mundial há uma crescente valorização dos mesmos pela sua estatura e produtividade, podendo produzir cerca de 8 a 10 litros de leite diariamente (FLORA, 2003; CERVENÁ, 2004). Além disso, são muito utilizados como atração em exposição, zoológicos e feiras. É uma opção rentável ao produtor devido ao menor custo de criação e possui produtividade similar a uma vaca tradicional, são animais precoces e quando bem manejados iniciam sua vida produtiva aos 14 meses, geralmente com uma cria anual e apresenta estro 50 dias após o parto (CERVENÁ, 2004).

Portanto, objetivo deste trabalho é relatar a produção *in vitro* de embriões de mini - vacas leiteiras e transferência para vacas receptoras de porte convencional das raças Girolando e Jersey, avaliando a produtividade de raças miniaturas e a eficiência das técnicas na reprodução desses animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Local, animais e manejo

O presente trabalho foi realizado entre os meses de outubro e novembro de 2019, em Palmas/TO. Os animais utilizados como doadoras e receptoras eram provenientes da Fazenda Nossa Senhora Aparecida, e que foram conduzidos para o Hospital Veterinário do CEULP/ULBRA, onde procedeu-se a aspiração à vácuo, rastreamento e seleção dos ovócitos.

Foram utilizadas nove mini vacas com boa aptidão leiteira (8 litros de leite/dia) criadas em sistema semi-intensivo, de alto valor genético, livres de doenças infecciosas e reprodutivas, com idade variando entre 3 e 10 anos, estando todas em lactação. Estes animais, eram criados sob o regime de confinamento, sendo sua dieta composta de silagem de milho, ração concentrada e fornecimento de água e sal mineral *ad libitum*. E foram selecionadas 20 vacas como receptoras dos embriões produzidos, sendo 15 vacas da raça Girolando e 5 vacas da raça Jersey. Esses animais passaram por avaliação clínica e ginecológica onde não foi evidenciado nenhuma alteração, com idade entre 2 e 8 anos, com bom escore corporal, todas estando em lactação.

Devido à baixa estatura dos animais, e ainda não possuir no mercado troncos de contenção específicos para o manejo das mini-vacas, foram realizadas adaptações na estrutura para possibilitar que facilitasse o acesso do médico veterinário ao aparelho reprodutor das mesmas, foram postas tábuas, de modo que se elevasse a altura dos animais no interior do tronco.

Obtenção de ovócitos

Os ovócitos foram aspirados pelo método de ovum pick-up (OPU), pelo fórnix vaginal. O procedimento de aspiração folicular foi realizado utilizando-se equipamento de ultrassom Aloka SSD500, com transdutor micro-convexo de 5MHZ, acoplado a guia de aspiração trans-vaginal, e as aspirações foram realizadas com agulha hipodérmica descartável 20G e sistema de aspiração Handle Cook. A pressão de vácuo/vazão foi ajustada previamente em 18mL/minuto. A técnica de PIVE foi realizada no laboratório de produção *in vitro* de embriões (Embriotec) localizado na cidade de Anápolis/GO.

Sincronização do ciclo estral de receptoras e transferência de embriões

As fêmeas receptoras, receberam protocolos hormonais com a finalidade de sincronização de cio, definido como D0, as vacas receberam um implante intravaginal composto de 1,0g de progesterona (Sincrogest[®]) e 2,0mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol[®]) por via intramuscular (IM). Após oito dias (D8), o implante intravaginal foi retirado e os animais receberam 2mL de cloprostenol sódica (Sincrocio[®]), 2mL de

gonadotrofina coriônica equina (Sincro eCG[®]) e 0,5mL de Cipionato de estradiol (E.C.P.[®]) por via IM. No D10 foi detectado cio nas as receptoras e no D17 foram inovuladas.

Análise Estatística

Para análise dos dados obtidos de taxa de recuperação, desenvolvimento embrionário e prenhez, que apresentavam distribuição normal, foi aplicado o teste do Chi-quadrado, pelo programa Prophet, versão 5.0 (BBN Systems and Technologies, 1996), em um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na aspiração folicular (OPU) foram obtidos um total de 116 ovócitos, uma média de aproximadamente 13 por fêmea, valor semelhante ao encontrado por Renesto e Coelho (2004) ao aspirar fêmeas Nelore em procedimento similar. Todos os ovócitos aspirados foram enviados ao laboratório e foram obtidos 27 embriões, um aproveitamento de 23,2 % dos folículos aspirados. A utilização de ovócitos imaturos pode interferir na eficiência da produção *in vitro* (BECHER, 2018). Os ovócitos classificados como viáveis foram enviados para PIVE em meio de maturação e transportados a uma temperatura de 37,5 °C, como realizado por Gonçalves *et al.*, (2017).

Apenas 85% (17/20) das receptoras estavam aptas a receber os embriões, e as inovuladas apresentaram uma taxa de prenhez de 76,4% (13/17), valor muito superior ao observado por Scanavez (2013) em raças mestiças que foi de 35,5%. A alta taxa de aproveitamento de receptoras, pode ser decorrente de manejo nutricional adequado (SARTORI e GUARDIERO, 2010). Deficiências nutricionais, principalmente de minerais, há diminuição da fertilidade, deficiência perdas gestacionais ou nascimentos de bezerras fracas (SOUZA, 2014). Spell *et al.*, (2001) obteve resultados similares ao descrever que a influência da sincronia embrião-receptora taxa de prenhez. Na PIVE, é um dos parâmetros mais importantes na seleção das receptoras. O que não foi observado nos resultados deste trabalho.

Os programas de transferência de embriões se iniciam com a identificação de receptoras, que estejam ciclando, sendo um forte indicador de que responderá satisfatoriamente a técnica de sincronização de ciclo estral com as doadoras (GOUVEIA, 2011). Em trabalho feito com mestiças leiteiras, onde foram realizadas 1110 transferências, não foi observado efeito significativo do grau de desenvolvimento do embrião sobre as taxas de prenhez e perdas gestacionais (SCANAVEZ *et al.*, 2013).

A raça pode ser um fator limitante para o sucesso da produção de embriões *in vitro*, sendo correto a aplicação em raças com alto potencial de recuperação ovocitária. Observa-se que há necessidade de maiores estudos sobre a aplicação da técnica em raças de maior potencial de recuperação de ovócitos e produção embrionária. Os dados também sugerem a necessidade de avaliação individual da fêmea para o sucesso da PIVE (CARVALHO *et al.*, 2012).

CONCLUSÕES

A produção *in vitro* é uma técnica viável, mesmo em pequenas propriedades e permite um maior aproveitamento da capacidade genética de cada animal. As mini-vacas são animais

muito produtivos, porém não se encontra na literatura parâmetros que possam ser usados como referência para a produção *in vitro* e transferência de embriões nessas raças. Entretanto, as raças miniaturas apresentaram resultados semelhantes aos de fêmeas bovinas de porte convencional equiparando a capacidade reprodutiva de ambas. Portanto, podemos concluir com a execução deste trabalho que resultados positivos foram obtidos aplicando biotécnicas reprodutivas em fêmeas bovinas miniaturas.

REFERÊNCIAS

- CARVALHO, A.A.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, A.P.R. Vitriificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.5, n.3, p.236-248, 2012.
- CERVENÁ, A. Mammals and humans: Domestication and commensals. In *Grzimek's Animal Life Encyclopedia*, Edited by Michael Hutchins, Dennis A. Thoney, and Melissa C. McDade. v.12: Mammals I. 2nd ed., Detroit: Gale, 2004. 372p.
- FLORA, C.B. Cattle. In *Encyclopedia of Food and Culture*. Edited by Solomon H. KATZ, v.1. New York: Charles Scribner's Sons, 2003. 718p.
- GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, M.A.L.M.; MEZZALIRA, A. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2^a ed., São Paulo, Editora Roca LTDA., p.195-224, 2007.
- GOUVEIA, F.F. A produção *in vitro* de embriões bovinos. 2011. 35p. (Monografia de Conclusão de Curso em Medicina Veterinária). Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, 2011.
- NEVES, J.P.; MIRANDA, K.L.; TORTORELLA, R.D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.39, p.418-421, 2010.
- RENESTO, A.; COELHO, L.A. Associação de biotécnicas: Aspiração folicular guiada por ultrassom e superovulação na produção *in vitro* e *in vivo* de embriões bovinos. 2007. 59p. (Dissertação de Mestrado em Reprodução Animal). Arquivos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, São Paulo, 2007.
- SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M.M. Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151635982010001300047>. Acesso em: 05 nov. 2019
- SCANAVEZ, A.L.; CAMPOS, C.C.; SANTOS, R.M. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.68, n.3, p.722-728, 2013.
- SPELL, A. R.; BEAL, W.E.; CORAH, L.R.; LAMB, G.C. Evaluating recipients and embryo factors that affect pregnancy rates transfer in beef cattle. *Theriogenology*. v.56, p.287-297, 2001.