

Desempenho de doadoras leiteiras mestiças F1 (Gir x Holandês) no sistema de produção *in vitro* de embriões

[Performance of dairy crossbred F1 donors (Gir x Holstein) in the production system *in vitro* embryo]

J.G.V. Grázia¹, R.O. Silveira², E.C.M. Pereira³, G.M. Santos²

¹Universidade Federal de Minas Gerais

²Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde - Univiçosa

³Universidade Federal de Uberlândia

RESUMO

O Brasil atualmente é detentor do terceiro maior rebanho de vacas leiteiras do mundo, composto, em sua maioria, de animais mestiços F1 (Gir X Holandês), os quais são bem adaptados às áreas tropicais. O objetivo do presente estudo foi investigar a eficiência da *ovum pick-up* (OPU) e da produção *in vitro* de embriões oriundos de doadoras Girolando com sêmen sexado de touros provenientes de duas raças, Gir e Holandesa. Foram utilizados dados referentes a 232 animais de diversos rebanhos, totalizando 4334 oócitos recuperados. Os oócitos foram classificados, e as estruturas viáveis (GI, GII e GIII) foram utilizadas para produção *in vitro* de embriões (PIVE). Foi observada uma média de oócitos recuperados para as doadoras F1 de 18,14±1,33. Além disso, notou-se que não houve diferença entre os dois cruzamentos utilizados, considerando média de total de embriões (4,96±0,40 e 6,56±0,76) para o cruzamento F1 X HPB (Holandês preto e branco) e F1 X Gir, respectivamente. Portanto, as doadoras F1 apresentaram potencial como doadoras de oócitos no sistema de produção *in vitro* de embriões, independentemente da raça do touro cujo sêmen foi utilizado.

Palavras-chave: Girolando, OPU, PIVE

ABSTRACT

Brazil currently has the third largest herd of dairy cattle in the world, composed mainly by F1 crossbred animals (Gyr x Holstein), which are well adapted to tropical areas. The aim of this study was to evaluate the efficiency of Girolando donors in OPU and *in vitro* production of embryos (IVEP) using sexed semen of bulls from two breeds, Gyr and Holstein. We used data from 232 animals coming from different herds and the total of recovered oocytes was 4334. The oocytes were classified according to their viability and the viable ones (GI, GII and GIII) were used for IVP. The average of oocyte recovery from F1 donors was 18.14±1.33. There was no difference on the average of embryos considering the crossing F1 X Holstein (4.96±0.40) and F1 X Gyr (6.56±0.76). In conclusion, F1 donors showed a potential for being oocyte donors in the system of *in vitro* production of embryos, regardless the breed of the bull.

Keywords: Girolando, OPU, IVEP

INTRODUÇÃO

O agronegócio do leite possui um papel de extrema importância na sociedade, uma vez que o produto final dessa atividade, o leite, é um alimento único por seu valor nutritivo e sua composição. O rebanho do continente americano

é considerado o segundo maior produtor de leite do mundo, depois apenas da Europa. Já o Brasil ocupa a posição de quinto maior produtor mundial de leite, com aproximadamente 25 bilhões de litros. Além disso, o país possui o terceiro maior rebanho de vacas leiteiras do mundo, composto, em sua maioria, da raça Girolando (Nanzer, 2010).

Recebido em 27 de março de 2015

Aceito em 15 de novembro de 2015

E-mail jvgvgrazia@gmail.com

A reprodução animal se torna cada vez mais alvo de estudos e aperfeiçoamentos, com o objetivo de se obterem, como produto final, doadoras com alta eficiência reprodutiva, garantindo e acelerando, assim, a produção de animais com potencial genético de destaque (Machado *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, a biotécnica de eleição para maximizar o número de descendentes dos melhores animais e acelerar o progresso genético dos rebanhos tem sido a produção *in vitro* de embriões (PIVE), associada à aspiração folicular guiada por ultrassom, da sigla inglesa *ovum pick-up* (OPU) (Varago *et al.*, 2008). Somada a isso, a possibilidade de uso de sêmen sexado se tornou uma grande vantagem, principalmente para os criadores de gado leiteiro, permitindo sobremaneira a produção de um grande número de fêmeas, sabidamente importante para a indústria de lácteos (Trigal *et al.*, 2012).

As raças zebuínas especializadas na produção de leite, como a Gir, possuem normalmente maior quantidade de complexos *cumulus*-oócitos (CCO) recuperados por sessão de aspiração folicular em relação aos animais taurinos, tal como a raça Holandesa (Pontes *et al.*, 2010; Viana *et al.*, 2004). Além disso, animais da raça zebuína são considerados bem adaptados a áreas tropicais, pois produzem grande quantidade de leite quando submetidos a condições adversas, como altas temperaturas, parasitas e pastagem pobre em nutrientes. Por essas características e pela boa eficiência reprodutiva, o interesse nessa raça vem crescendo nos últimos anos. Essas características são mantidas no animal mestiço (Gir X Holandês), usualmente denominado “Girolando”, que é o gado leiteiro mais popular nas Américas Central e do Sul (Pontes *et al.*, 2010).

O objetivo do presente estudo foi investigar a eficiência da OPU e da produção *in vitro* de embriões oriundos de doadoras F1 (Gir X Holandês) com sêmen sexado de touros de duas raças puras, Gir e Holandês.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com os resultados do laboratório comercial de produção *in vitro* de embriões bovinos, Ativa Embriões, localizado em Juiz de Fora, MG. Foram utilizados dados de vacas F1 (Gir X Holandês) (n=232), provenientes de diferentes rebanhos das regiões da Zona da Mata de Minas Gerais e Campo das Vertentes e Sul do estado do Rio de Janeiro. A totalidade desses animais era examinada previamente, e estes se apresentavam com histórico reprodutivo (idade, número de aspirações, taxa de produção de oócitos e embriões) considerado normal.

A aspiração folicular foi realizada com auxílio de equipamento de ultrassom portátil equipado com transdutor setorial de 7,5MHz, adaptado para exame intravaginal e com guia para agulha de biópsia (Aquila, Esaote-Pie Medical, Maastricht, Holanda). Agulhas descartáveis (20 G) foram acopladas a um sistema de vácuo com pressão aproximada de 50mmHg ou equivalente ao fluxo de 11mL por minuto. O líquido folicular e os complexos *cumulus*-oócitos (CCO) foram aspirados para um tubo de 50mL contendo 10mL de Dulbecco's PBS (DPBS) (Nutricell, Campinas, SP, Brasil), suplementado com 5% de soro fetal bovino (Nutricell) e 100UI de heparina sódica (Liquemine, Roche, Basileia, Suíça), e previamente aquecido a 36°C. Todos os CCO recuperados (n=4334) foram mantidos em criotubos (TPP; capacidade de 1,5mL), devidamente identificados com meio tamponado, e transportados para o laboratório no intervalo de três a 12 horas a 37°C. Ao chegarem ao laboratório, os CCO foram classificados segundo Viana *et al.* (2004) (Tab. 1), por um mesmo indivíduo. Somente oócitos considerados viáveis foram submetidos ao processo de maturação *in vitro* (MIV).

Todos os animais selecionados para a aspiração folicular do presente estudo não tiveram a utilização de protocolos hormonais para a sincronização do cio. As doadoras tiveram os oócitos recuperados independentemente do dia do ciclo estral.

Desempenho de doadoras...

Tabela 1. Classificação dos complexos *cumulus*-oócitos recuperados por punção folicular guiada por ultrassom

Classificação	Descrição
Grau I	CCO compacto, mais do que três camadas de células do <i>cumulus</i> e oócito com citoplasma homogêneo
Grau II	CCO compactos, com três ou menos camadas de células do <i>cumulus</i> , ou oócito com citoplasma levemente heterogêneo
Grau III	Oócitos mostrando remoção completa das células do <i>cumulus</i> de menos que 1/3 da superfície da zona pelúcida
Desnudo e/ou degenerado	Oócitos com nenhuma célula do <i>cumulus</i> sobre a maior parte da zona pelúcida e/ou vacuolização, retração do citoplasma
<i>Cumulus</i> expandido	CCO mostrando expansão das células do <i>cumulus</i>

Adaptado de Viana *et al.*, 2004.

A MIV dos CCO foi realizada em meio TCM 199 (Gibco) acrescido de 10% de soro fetal bovino, 120 μ L de FSH, 120 μ L de LH, 4,4mg/mL de piruvato e 120 μ L de antibiótico, em gotas de 70 μ L, mantido em estufa incubadora a 38,8°C, com 5% de CO₂ em ar atmosférico e 95% de umidade, por 24 horas. Os oócitos de cada doadora foram colocados em gotas separadas em grupos de um a 30 por gota, conforme a produção individual dos animais.

Os CCO maturados foram fecundados com sêmen de touros previamente provados. Para a preparação dos espermatozoides, foi utilizado o método do gradiente de Percoll (Invitrogen®). A fecundação foi realizada na gota de 60 μ L de meio FIV contendo heparina e PHE, a dose inseminante utilizada foi de aproximadamente 2x10⁶ espermatozoides/mL, sob óleo mineral, por um período de aproximadamente de 18-22 horas, nas mesmas condições atmosféricas da maturação da etapa anterior.

Para o cultivo dos zigotos presumíveis, foi utilizado CR4aa (Invitrogen®) contendo soro fetal bovino e BSA. Os embriões (n=1219) foram cocultivados com células da granulosa nas mesmas condições da fecundação, no entanto, em gotas de 50 μ L, sob óleo mineral. Após 72 horas do início do cultivo, foi realizado o primeiro *feeding*, que consiste na troca de 50% do meio e na taxa de clivagem avaliada. No sexto dia, foi realizado novamente o procedimento *feeding*. No sexto e sétimo dias após a fecundação, a taxa de blastocisto foi avaliada por meio da visualização dos embriões, utilizando-se

microscópio estereoscópio (Nikon SMZ 745) sob aumento de 40x.

Os dados do trabalho foram submetidos ao teste de ANOVA, e diferenças entre os grupos comparadas pelo teste de Tukey. Diferenças percentuais foram comparadas por qui-quadrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para caracterizar as doadoras, a primeira avaliação foi em relação à eficiência na PIVE comparando-se o rendimento de produção de oócitos obtidos por meio de aspiração folicular (Tab. 2), bem como a capacidade de produção *in vitro* de embriões (Tab. 3). A média de CCO total dos animais F1(18,14 \pm 1,33) foi similar à produção de CCO da raça Gir (19,1 \pm 0,9) e superior à produção da raça Holandesa (13,3 \pm 0,6) encontradas por Grázia *et al.* (2013), e superior à encontrada por Oliveira *et al.* (2013) nas raças Gir (11,96 \pm 0,69) e Holandesa (6,76 \pm 0,33). Essa diferença pode ser explicada pelas diversas diferenças na fisiologia ovariana entre os animais zebuínos e taurinos, como maior número de ondas de crescimento folicular, menor persistência e diâmetro do folículo dominante no momento da divergência e maior número de folículos por onda de crescimento nos animais zebuínos (Viana *et al.*, 2004), conseqüentemente o número médio de CCO aspirados é superior ao daqueles aspirados nas raças taurinas. Neste estudo, é bem definida que a característica de maior produção de CCO dos animais zebuínos, mais especificamente da raça Gir, foi mantida na geração F1, sendo essa uma característica de interesse no processo de OPU/PIVE.

Tabela 2. Parâmetros da aspiração folicular (CCO GI, CCO GII, CCO GIII, CCO viáveis, % de viáveis, degenerados e total de estruturas) das doadoras mestiças F1 (Gir X Holandesa)

Aspiração folicular	
Parâmetros	F1
CCO GI	0,44±0,14
CCO GII	1,05±0,28
CCO GIII	9,93±0,84
CCO viáveis	11,37±0,84
% de viáveis	63
Degenerados	6,77±0,67
Total de estruturas	18,14±1,33

Tabela 3. Parâmetros de produção de embrião *in vitro* (clivados, taxa de clivagem, embriões no sétimo dia de CIV, taxa de D7, embriões no oitavo dia de CIV, taxa de D8, total de embriões e taxa total de embriões) das doadoras mestiças F1 (Gir X Holandesa)

Produção <i>in vitro</i> de embriões		
Parâmetros	F1 X HPB	F1 X Gir
Clivados	9,13±0,50a	10,4±0,87a
Taxa de clivagem (%)	84a	90 ^a
D7	3,71±0,36a	5±0,67a
Taxa de D7 (%)	33a	43 ^a
D8	0,83±0,12a	1,4±0,24a
Taxa de D8 (%)	8a	13 ^a
Total de embriões	4,96±0,40a	6,56±0,76a
Taxa de embriões (%)	43a	55 ^a

*Raça materna x raça paterna.

Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha diferem ($P>0,05$).

Adicionalmente, avaliou-se a raça do touro cujo sêmen foi utilizado para a fertilização dos oócitos. Dessa maneira, objetivou-se comparar se existem diferenças também no potencial de desenvolvimento *in vitro* dos CCO em função dos acasalamentos, utilizando-se touros das raças Holandesa e Gir como parâmetros. Observou-se que não houve diferença entre os dois acasalamentos nos parâmetros analisados (Tab. 3), o que corrobora os estudos de Nabhan (2011) e Saito (2006), cujos efeitos da raça do touro também não foram evidenciados, pois as taxas de blastocisto e de blastocisto eclodido não diferem entre os touros Gir e Holandês.

A produção de embriões utilizando como matriz doadoras mestiças F1 se mostrou viável quando comparadas as raças sabidamente eficientes na PIVE, apresentando média superior às doadoras da raça Holandesa (32,5% acasaladas com touro HPB e 40,8% acasaladas com touro Gir) e similar às doadoras da raça Gir (55,4% acasaladas com touro Gir e 54,9% acasaladas

com touro HPB) descritas por Grázia et al. (2013).

Os animais da geração F1 apresentam 50% de sangue Gir e 50% de sangue Holandês, e o resultado inferior de produção *in vitro* de embriões do acasalamento F1 X HPB pode ser explicado por esses embriões apresentarem 75% de sangue Holandês, raça que, segundo Camargo et al. (2007), apresenta menor competência no processo de PIVE quando comparada com animais zebuínos. Outra possível explicação seria o estresse térmico que também influencia na produção, diminuindo significativamente as taxas de blastocisto e de blastocisto eclodido, tanto para oócitos HPB fertilizados com sêmen Gir quanto fertilizados com sêmen HPB (Saito, 2006). Essa maior sensibilidade ao estresse térmico das raças taurinas está relacionada à menor adaptação dessas às condições climáticas em que a temperatura é mais elevada (Hansen, 2004), como é o caso das regiões onde o presente estudo foi realizado.

Já os embriões provenientes do acasalamento F1 X Gir, que apresentam 25% de sangue Holandês e 75% de sangue Gir, possuem maior capacidade de produção *in vitro* de embriões. De acordo com Nabhan *et al.* (2011), embriões zebuínos são mais resistentes do que embriões mestiços (oócito taurino x sêmen zebuino) e taurinos (HPB) desenvolvidos *in vitro*.

Para verificar a influência do sistema de cultivo na produção *in vitro* de embriões de doadoras mestiças F1, foram agrupados os animais de acordo com a sua taxa de produção de embriões.

Dessa maneira, quando se observou a eficiência do sistema de cultivo (Fig. 1), foi possível perceber que algumas doadoras alcançaram a produção máxima de embriões. Ao se manter o mesmo sistema de cultivo e se alterarem as doadoras e os touros, a variação na produção de embriões permaneceu com alguns indivíduos produzindo índices de 100% de embriões (21/232) enquanto outros não produziram embriões (30/232). Esse mesmo padrão de distribuição já foi encontrado para doadoras Gir e Holandesa (Grázia *et al.*, 2013).

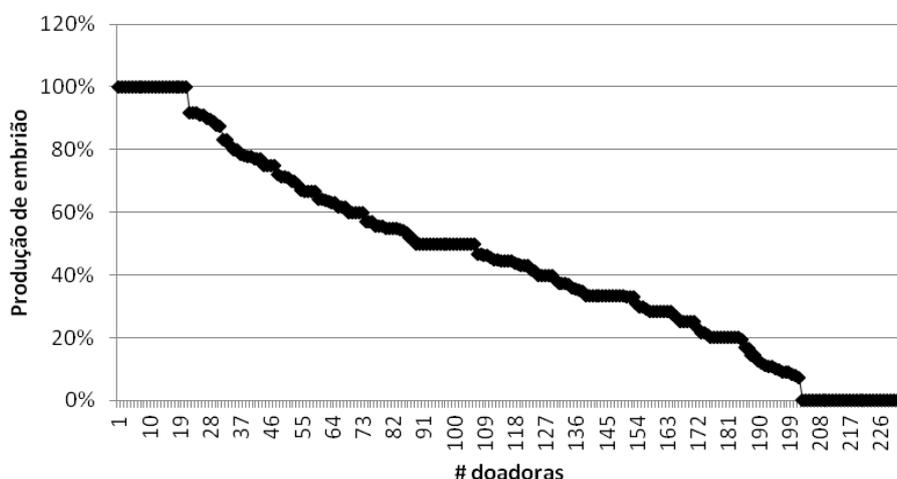


Figura 1. Distribuição das doadoras mestiças F1 (Gir X Holandês) baseada na produção de embrião (%).

CONCLUSÃO

Vacas mestiças F1 (Gir X Holandês) apresentam potencial como doadoras de oócitos e eficiência no sistema de produção *in vitro* de embriões similar às vacas zebuínas, independentemente da raça do touro doador do sêmen utilizado. Dessa maneira, vacas F1 podem ser utilizadas como doadoras de oócito para PIVE, levando em consideração apenas a eficiência de produção de embriões *in vitro*.

REFERÊNCIAS

CAMARGO, L.S.; VIANA, J.H.M; RAMOS, A.A.; SERAPIÃO, R.V. *et al.* Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. *Theriogenology*, v.68, p.626-632, 2007.

GRAZIA, J.G.V.; ARASHIRO, E.K.N.; PALHÃO, M.P. *et al.* Is it possible to increase the efficiency of *in vitro* embryo production in Holstein by preselection of donors with great oocyte production. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 27., 2013. *Reprod. Dom. Anim.* v.10, p.526-526, 2013. (Resumo).

HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim. Reprod. Sci.*, v.82-83, p.349-360, 2004.

MACHADO, C.I.I.U.F.; GUIMARÃES, A.C.G.; GONÇALVES, C.G.M.; *et al.* Influência do sêmen de diferentes touros sobre as taxas de fecundação *in vitro* e desenvolvimento de embriões. In: SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 2012, Bagé. *Anais ... Bagé: Universidade Federal do Pampa*, 2012. v.4.

- NABHAN, T.; SATRAPA, R.A.; SIMÕES, R.A.L. *et al.* Influência da raça do touro (*Bos indicus* x *Bos taurus*) na tolerância ao estresse térmico calórico de embriões bovinos produzidos *in vitro*. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.48, p.332-335, 2011.
- NANZER, T.A.D.T. *Produção de leite no Brasil e participação da genética Girolando com ênfase em reprodução*. 2010. Disponível em: <<http://www.girolando.com.br/index.php?pagina=Site/tecnico,39>>. Acessado em: 17 set. 2014.
- OLIVEIRA, C.S. Produção *in vitro* de embriões bovinos F1 a partir de doadoras de oócitos da raça Gir Leiteiro e Holandesa. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 2013, Uberaba. *Anais...* Uberaba: SBMA, 2013. (Resumo).
- PONTES, J.H.; SILVA, K.C.; BASSO, A.C. *et al.* Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*, v.74, p.1349-1355, 2010.
- SAITO, D. Y. *Estudo da influência da raça do touro (Bos indicus x Bos taurus) na resistência de embriões bovinos ao estresse térmico calórico in vitro, no estágio inicial de desenvolvimento(Tudo em Itálico?)*. 2006. 42f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, SP.
- TRIGAL, B.; GÓMEZ, E.; CAAMAÑO, J.N. *et al.* *In vitro* and *in vivo* quality of bovine embryo *in vitro* produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology*, v.78, p.1465-1475, 2012.
- VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.32, p.100-109, 2008.
- VIANA, J.H.M. Pre-synchronization of cows for cumulus oocyte complexes recover: Partial results. *Act. Sci. Vet.*, v.31 p.187, 2004.