

Eventos Técnicos & Científicos

2

Julho, 2024

Anais 18º Workshop sobre Produção de Caprinos na Região da Mata Atlântica



5 e 6 de julho de 2024
Coronel Pacheco, MG



Embrapa

Caprinos e Ovinos

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Caprinos e Ovinos
Ministério da Agricultura e Pecuária*

e-ISSN 2966-3733

Eventos Técnicos & Científicos

2

Julho, 2024

Anais 18º Workshop sobre Produção de Caprinos na Região da Mata Atlântica

5 e 6 de julho de 2024
Coronel Pacheco, MG

Embrapa Caprinos e Ovinos
Sobral, CE
2024

Produção e criopreservação de embriões: ferramentas para melhorar a genética em pequenos ruminantes

Joanna Maria Gonçalves Souza-Fabjan⁽¹⁾, Juliana Nascimento Duarte Rodrigues⁽²⁾, Jeferson Ferreira da Fonseca⁽³⁾

⁽¹⁾Professora, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. ⁽²⁾Professora, Universidade Federal Rural da Amazônia, Paragominas, PA. ⁽³⁾Pesquisador, Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE.

Introdução

A produção de pequenos ruminantes é uma fonte importante de leite, carne, lã ou fibras e pele, especialmente em países em desenvolvimento. Em geral, as populações continuam a expandir-se globalmente e o número de pequenos ruminantes aumentou significativamente nos últimos 30 anos em todo o mundo. No entanto, apesar de representarem um número relativamente elevado de animais, os pequenos ruminantes no Brasil não foram melhorados geneticamente na mesma medida que, por exemplo, o gado bovino. De fato, as tecnologias de reprodução assistida são ferramentas excelentes para contornar essa limitação nos programas de melhoramento genético de pequenos ruminantes.

A produção de embriões *in vitro* (PIVE) e a ovulação múltipla e transferência de embriões (MOET) são técnicas que têm contribuído substancialmente para a melhoria genética dos ruminantes. Ao contrário da espécie bovina, em que as principais tendências recentes no mercado de embriões estão relacionadas com a diminuição de MOET e o aumento de embriões PIVE, a MOET continua a ser a principal ferramenta utilizada para a produção de embriões em pequenos ruminantes (Souza-Fabjan et al., 2021).

A criopreservação bem-sucedida de embriões de pequenos ruminantes pode aprimorar outras biotecnologias reprodutivas, como a MOET ou a PIVE. No entanto, taxas de gestação mais baixas são relatadas após a transferência de embriões criopreservados, em comparação com embriões frescos, independentemente da origem dos embriões (Bair et al., 2020). A diminuição da competência de desenvolvimento dos embriões de mamíferos após a criopreservação está principalmente associada aos danos morfológicos e funcionais que as células sofrem durante o processo. A extensão da lesão criogênica é muito variável e depende da espécie, estágio de desenvolvimento, origem do embrião e técnica de criopreservação (congelamento lento ou vitrificação). A aquisição e a criopreservação de sêmen de alta qualidade e embriões são as estratégias mais eficientes para os bancos de germoplasma. Embora a produção de embriões seja mais complexa e cara do que a coleta de sêmen, ela é o método preferido no processo de reconstituição de uma raça/espécie (Boettcher et al., 2005).

Esta revisão aborda as opções para o uso eficaz de técnicas de produção de embriões *in vivo* e *in vitro*, com foco na recuperação não cirúrgica de embriões em cabras e

ovelhas, bem como na criopreservação de embriões, como ferramentas para apoiar o melhoramento genético nas espécies.

Produção de embriões in vivo e in vitro

Tecnologias de reprodução assistida, como a produção de embriões in vivo e in vitro, são de suma importância para produtores de pequenos ruminantes. As tecnologias de reprodução assistida, mais que úteis, devem ser eficientes, acessíveis, seguras (com baixa invasividade) e relativamente fáceis de serem realizadas em fazendas comerciais. Em relação à MOET, embora a recuperação não cirúrgica de embriões possa ser utilizada de forma muito eficiente em pequenos ruminantes (Souza-Fabjan et al., 2023), a coleta de embriões in vivo globalmente ainda é geralmente realizada por laparotomia. Isso ocorre, principalmente, devido à anatomia da cérvix e ao pequeno tamanho corporal das fêmeas, o que limita a apalpação retal e os exames digitais. No entanto, essa técnica cirúrgica requer jejum prévio dos animais e o uso de anestésicos que podem representar riscos para os animais. Além disso, há o risco de aderências, sequelas pós-cirúrgicas e estresse, que podem prejudicar a produção repetida de embriões. Recentemente, foi demonstrado em ovelhas que a coleta transcervical de embriões é tão eficaz e menos estressante para o bem-estar animal que a laparotomia (Santos et al., 2020).

A técnica PIVE envolve quatro etapas: coleta de complexos cúmulos-oócito (COC), maturação in vitro, fertilização in vitro e desenvolvimento in vitro dos embriões até o estágio de blastocisto. A estimulação ovariana hormonal é comumente utilizada em fêmeas vivas para aumentar o número de folículos disponíveis e, conseqüentemente, o número de oócitos recuperados por laparoscopia (LOPU). Para uma equipe/grupo experiente, a coleta de ovócitos por LOPU leva cerca de 20 minutos por doadora. Como parte do procedimento, as doadoras devem ficar em jejum por 24h antes da laparoscopia. Durante o procedimento, os animais são submetidos à anestesia geral e posicionados de cabeça para baixo em uma cama ou mesa de laparoscopia. Embora a logística para a recuperação de COCs por LOPU seja mais complexa e onerosa em pequenos ruminantes do que em bovinos, os resultados gerais da PIVE em pequenos ruminantes são semelhantes aos relatados em bovinos. Apesar dos esforços consideráveis realizados por cientistas em todo o mundo para melhorar as taxas de blastocistos, os problemas mais críticos relacionados à PIVE ainda não foram resolvidos. A inconsistência nos resultados entre laboratórios, a alta variabilidade no número e na qualidade dos oócitos recuperados e a baixa viabilidade embrionária após a criopreservação ainda limitam a disseminação da técnica (Souza-Fabjan et al., 2021).

Criopreservação de embriões

Os embriões de mamíferos podem ser criopreservados por meio de congelamento lento convencional (SF) ou vitrificação (VIT). O SF é caracterizado por um resfriamento gradual e o uso de baixas concentrações de crioprotetores, que são tóxicos. A VIT é uma técnica rápida que utiliza altas concentrações de crioprotetores (portanto, alta toxicidade) antes de imergir os embriões em nitrogênio líquido. O primeiro nascimento de um bebê após a transferência de um embrião criopreservado usando SF foi em 1976, enquanto o primeiro nascimento de um embrião vitrificado foi relatado 14 anos depois. A VIT tornou-

-se um método útil para a criopreservação de embriões por ser mais rápida, simples, não exigir equipamentos caros e ser mais eficaz do que o SF (Souza-Fabjan et al., 2021).

Recentemente, Santos-Neto et al. (2017) relataram taxas mais altas de gestação para embriões derivados de MOET em ovelhas (69% versus 30%) em comparação com PIVE, e melhores taxas de nascimento após VIT (Cryotop) em comparação com SF. No entanto, os resultados não são consistentes na literatura nesse aspecto. Diferentes estágios do embrião podem exibir diferentes graus de criotolerância. Por exemplo, em cabras, a sobrevivência de mórulas é menor após a criopreservação em comparação com blastocistos. Em ovelhas, a sobrevivência de mórulas e embriões de 16 a 32 células foi significativamente menor do que a de embriões mais avançados em embriões PIVE de ovelha submetidos à VIT (Li et al., 2020). Portanto, os blastocistos expandidos são o estágio mais adequado para a vitrificação de embriões (Li et al., 2020). Em geral, é amplamente aceito que à medida que o embrião se desenvolve, aumenta sua viabilidade após o congelamento.

Conclusão

A necessidade de avançar no progresso da reprodução de pequenos ruminantes requer a incorporação de programas de MOET, PIVE e criopreservação como parte das estratégias modernas de criação de animais. Melhorias contínuas são necessárias para garantir que a aplicação dessas tecnologias seja segura e maximize os resultados de produtividade em cabras e ovelhas.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Projetos 403909/2021-0 e 303727/2021-7), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig - BPD 00308-22), e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo suporte financeiro que gerou importantes dados deste manuscrito.

Referências

- BOETTCHER, P. J.; STELLA, A.; PIZZI, F.; GANDINI, G. The combined use of embryos and semen for cryogenic conservation of mammalian livestock genetic resources. **Genetics Selection Evolution**, v. 37, n. 6, p. 657-675, Nov./Dec. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1051/gse:2005022>.
- BRAIR, V. L.; MAIA, A. L. R. S.; CORREIA, L. F. L.; BARBOSA, N. O.; SANTOS, J. D. R.; BRANDÃO, F. Z.; FONSECA, J. F.; BATISTA, R. I. T. P.; SOUZA-FABJAN, J. M. G. Gene expression patterns of in vivo-derived sheep blastocysts is more affected by vitrification than slow freezing technique. **Cryobiology**, v. 95, p. 110-115, Aug. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.05.009>.
- LI, X.; WANG, L.; YIN, C.; LIN, J.; WU, Y.; CHEN, D.; QIU, C.; JIA, B.; HUANG, J.; JIANG, X.; YANG, L.; LIU, L. Antifreeze protein from *Anatolia polita* (ApAFP914) improved outcome of vitrified in vitro sheep embryos. **Cryobiology**, v. 93, p. 109-114, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.02.001>.

SANTOS, J. D. R.; UNGERFELD, R.; BALARO, M. F. A.; SOUZA-FABJAN, J. M. G.; COSENTINO, I. O.; BRAIR, V. L.; SOUZA, C. V.; PINTO, P. H. N.; BADE, A. L. C.; FONSECA, J. F.; BRANDÃO, F. Z. Transcervical vs. laparotomy embryo collection in ewes: the effectiveness and welfare implications of each technique. **Theriogenology**, v. 153, p. 112-121, Sept. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.004>.

SANTOS-NETO, P. C. dos; CUADRO, F.; BARRERA, N.; CRISPO, M.; MENCHACA, A. Embryo survival and birth rate after minimum volume vitrification or slow freezing of in vivo and in vitro produced ovine embryos. **Cryobiology**, v. 78, p. 8-14, Oct. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.08.002>.

SOUZA-FABJAN, J. M. G.; BATISTA, R. I. T. P.; CORREIA, L. F. L.; PARAMIO, M. T.; FONSECA, J. F.; FREITAS, V. J. F.; MERMILLOD, P. In vitro production of small ruminant embryos: latest improvements and further research. **Reproduction Fertility and Development**, v. 33, n. 2, p. 31-54, Jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD20206>.

SOUZA-FABJAN, J. M. G.; OLIVEIRA, M. E. F.; GUIMARÃES, M. P. P.; BRANDÃO, F. Z.; BARTLEWSKI, P. M.; FONSECA, J. F. Review: Non-surgical artificial insemination and embryo recovery as safe tools for genetic preservation in small ruminants. **Animal. The International Journal of Animal Biosciences**, v. 17, e100787, May, 2023. Supplement 1. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100787>.