

Artículo original:

FACTORES QUE AFECTAN A LA FECUNDACIÓN IN VITRO EN BOVINOS

Factores que afetam a eficiência da fertilização in vitro em bovinos

Siqueira, L.G.B.(1*); J.F. Fonseca(2); L.S.A. Camargo(1); J.H.M. Viana(1) **INTRODUÇÃO**

(1) *Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil. CEP:36038-330*

(2) *Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, Brasil*

*E-mail: lgbsiqueira@cnpqgl.embrapa.br

A produção de embriões bovinos por fertilização in vitro (FIV), no Brasil, foi inicialmente utilizada para atender a situações específicas, como a obtenção de produtos de doadoras com problemas adquiridos de fertilidade. Desta forma, até o final da década de 1990, a FIV no Brasil era uma atividade basicamente restrita a laboratórios de instituições de ensino e pesquisa e, portanto, sem expressão comercial. Por ser um processo tecnicamente complexo e com elevado custo de implantação, estimava-se que a produção de embriões em laboratório seria utilizada por grupos restritos, ocupando apenas nichos específicos de mercado como, por exemplo, o mercado de animais de alto valor (“show cows”). Nos anos seguintes, contudo, o uso da técnica apresentou uma expansão significativa, substituindo a superovulação (também denominada transferência de embriões convencional) como técnica de eleição para a produção de embriões, particularmente em raças zebrúinas, e possibilitando ao Brasil tornar-se o maior produtor mundial e referência no uso de FIV em bovinos. O sucesso comercial da técnica no Brasil foi decorrente de uma conjunção de fatores, relacionados a eficiência intrínseca à produção de embriões, a fatores de mercado, e também ao desenvolvimento de tecnologias associadas e de novos conceitos de aplicação. No presente trabalho são discutidos alguns destes fatores e suas implicações para o mercado de tecnologias de embriões

O crescimento do uso comercial da FIV no Brasil

A expansão no uso comercial da fertilização in vitro e as consequentes implicações no mercado de embriões bovinos no Brasil foi um fenômeno sem paralelo em outros países do mundo, e tornou-se um modelo importante para demonstrar as potencialidades e as limitações da técnica. Até o final da década de 90 a produção in vivo (por superovulação) era a única tecnologia de embriões efetivamente disponível em escala comercial. Nos últimos 12 anos, contudo, a FIV tornou-se inicialmente uma opção e, posteriormente, a técnica de eleição para a produção de embriões em bovinos, principalmente em raças zebrúinas. Além de substituir a superovulação convencional, a FIV propiciou novas aplicações e

possibilidades para o mercado de genética bovina, resultando em aumento significativo do total de embriões transferidos no país (Viana *et al.*, 2010b), e levando o mercado nacional de embriões para um novo patamar (>250.000 embriões produzidos/ano) O crescimento do uso de tecnologias de embriões no Brasil também resultou em aumento na participação relativa do país nos totais mundiais (Stroud, 2011). A evolução na produção de embriões bovinos no Brasil na última década está demonstrada na Figura 1

Fatores que influenciaram o sucesso comercial da FIV

I. Eficiência da técnica

A despeito do grande progresso observado nas últimas décadas, a FIV ainda é uma técnica caracterizada por baixa eficiência relativa. Diferentes estudos relatam taxas de aproximadamente 70% na recuperação de COCs por aspiração folicular em animais não estimulados (Seneda *et al.*, 2001; Viana *et al.*, 2004), eficiência de 10 a 40% na produção de embriões (considerando as etapas de maturação, fecundação e cultivo até a fase de blastocisto) (van Wagtenonk-de Leeuw *et al.*, 2006; Lonergan & Fair, 2008; Rizos *et al.*, 2008), e taxas de gestação entre 30 e 40% (Peterson & Lee, 2003; Pontes *et al.*, 2009; Siqueira *et al.*, 2009), além de mortalidade perinatal superior à normal (Peterson & Lee, 2003). Desta forma, mesmo nas avaliações mais otimistas a eficiência global do processo dificilmente ultrapassa 10% (van Wagtenonk-de Leeuw *et al.*, 2006).



Figura 1: Evolução da produção de embriões bovinos no Brasil, por técnica, no período 1995-2009. (TE: embriões produzidos por superovulação, FIV: embriões produzidos in vitro). Adaptado de Viana *et al.* (2012).



Ganhos substanciais nestes indicadores são improváveis, pois são limitados principalmente pela qualidade inicial dos COCs aspirados (Blondin *et al.*, 2002; Merton *et al.*, 2003). A eficiência e, conseqüentemente, a viabilidade econômica da FIV, estão, portanto, diretamente relacionadas ao número de folículos disponíveis para aspiração nos ovários das doadoras e à qualidade e conseqüente potencial de desenvolvimento dos oócitos recuperados.

No Brasil a FIV tem sido utilizada principalmente em animais de raças zebuínas. Estas raças apresentam diversas diferenças na fisiologia ovariana, como maior número de ondas de crescimento folicular (Figueiredo *et al.*, 1997; Viana *et al.*, 2000), menor persistência e diâmetro do folículo dominante no momento da divergência (Sartorelli *et al.*, 2005; Viana *et al.*, 2010a) e maior número de folículos por onda de crescimento (Viana *et al.*, 2000). Conseqüentemente, o número médio de COCs aspirados em centrais comerciais do Brasil (Tabela 1), que trabalham predominantemente com raças zebuínas, é consistentemente superior ao relatado por centrais européias (4-6) (Lopes *et al.*, 2006; De Roover *et al.*, 2008). São comuns relatos de animais produzindo acima de 50 COCs por coleta, havendo um registro da aspiração de mais de 500 COCs em uma doadora da raça Nelore (Santos *et al.*, 2005).

Tabela 1: Resultados consolidados de quatro diferentes centrais comerciais de produção de embriões bovinos in vitro no Brasil. Os dados foram obtidos pelo somatório dos resultados parciais de cada central no período de um ano (Viana *et al.*, 2010b).

Indicador de eficiência	Valor médio (N)	Varição
COC recuperados por aspiração	19,9 (528.743/26.598)	15,2-24,4
Taxa de embriões*	35,4% (123.624/348.957)	32,9-41,2%
Taxa de gestação*	38,5% (30.729/79.798)	36,0-41,0%

* Foram computados apenas os embriões e gestações que puderam ser vinculados diretamente ao número de COCs em cultivo e embriões produzidos, respectivamente

Os resultados parciais obtidos comercialmente por diferentes centrais de PIVE no Brasil permitem projetar um rendimento médio de 2,7 gestações por sessão de aspiração. Em contraste, a compilação dos registros de resultados da PIVE na Europa entre 2000 e 2003 (Thibier 2001, 2002, 2004) mostra uma produção média de 1,6 embriões por sessão de aspiração (28.209 embriões/18.140 OPU), o que, mesmo considerando-se uma taxa hipotética de gestação de 50%, significa um resultado final inferior a uma gestação por aspiração, ou seja, menos de 1/3 do resultado médio obtido em raças zebuínas no Brasil.

Além do maior número de COCs recuperados, a avaliação de resultados obtidos em escala comercial indica também maiores taxas de formação de blastocistos em raças zebuínas (Watanabe *et al.*, 2008). Estes resultados podem refletir uma maior qualidade intrínseca dos oócitos ou o eventual efeito aditivo resultante de um maior número de COCs em cultivo (Ferry *et al.*, 1994; Donnay *et al.*, 1997). Em qualquer um dos casos, o maior número de oócitos obtidos por sessão de aspiração, associado às boas taxas de embriões obtidos em raças zebuínas, contribuíram decisivamente para a expansão do uso da PIVE no Brasil.

II. Fatores de mercado

A produção de embriões por fertilização in vitro requer um alto investimento em estrutura física e equipamentos, quando comparada a transferência de embriões convencional. Desta forma, a viabilidade econômica da técnica é fortemente influenciada pela escala de uso, e conseqüentemente pela demanda por animais geneticamente superiores.

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo (200 milhões de animais), e o primeiro em produção comercial (IBGE 2010). Deste, a maior parte é formada de animais zebuínos ou seus cruzamentos, criados para a produção de carne em sistemas extensivos. A conseqüente demanda por touros de reposição, naturalmente reprimida pela capacidade de oferta dos rebanhos superiores e pressionada pela necessidade de ganhos de produtividade em função do aumento dos custos de produção, criou a primeira oportunidade para o uso em larga escala da PIVE. Desta forma, o sucesso comercial da técnica foi baseado inicialmente na grande demanda do setor produtivo, e não no custo unitário dos embriões ou gestações geradas.

Outro fator importante para o avanço da FIV no Brasil foi a experiência prévia positiva com o uso da produção in vivo de embriões. Quando a PIVE começou a ganhar expressão comercial, o Brasil já tinha uma participação expressiva na produção mundial de embriões, tendo ocupado no ano 2000 a 1ª posição no ranking dos países fora do eixo EUA-Canadá (Thibier 2001), além de possuir a maior sociedade técnico-científica nacional na área (SBTE), com um número de associados inferior apenas ao da IETS (Hasler, 2003). O uso expressivo da TE no passado possibilitou o crescimento de um mercado de produtos e serviços relacionados ao uso das tecnologias de embriões, incluindo o fornecimento de hormônios, meios de cultivo, materiais descartáveis, venda de receptoras e prestação de consultoria técnica. Este mercado adaptou-se rapidamente para atender à logística da FIV.

III. Novas tecnologias e conceitos de aplicação

Além dos fatores já mencionados, relacionados a eficiência relativa e ao mercado, o uso da FIV também é influenciado pelo desenvolvimento de tecnologias associadas e pelos conceitos de aplicação. Um exemplo disso é o recente aumento no uso da FIV em raças leiteira no Brasil. O crescimento inicial da FIV no Brasil foi associado principalmente às raças zebuínas de corte que, chegaram a responder por 88,0% do total de embriões produzidos em 2006. Nos últimos anos, contudo, observou-se um crescimento progressivo da atividade de embriões em raças leiteiras (Viana *et al.*, 2012), diretamente relacionado à produção in vitro. O uso da FIV na raça Gir, por exemplo, aumentou mais de 600% neste período. Este expressivo aumento na FIV em raças leiteiras pode ser atribuído, em grande parte, a disponibilidade de sêmen sexado, uma vez que o maior percentual de machos nascidos com o uso de sêmen convencional (Camargo *et al.*, 2010) era um dos fatores que inviabilizava o uso da técnica em animais leiteiros.

Mais recentemente, o uso da FIV em raças leiteiras também foi impulsionado pela demanda de animais produção, como no caso dos rebanhos F1. Esta é uma importante mudança de paradigma, uma vez que a FIV deixa de ser uma ferramenta relacionada apenas a programas de melhoramento em raças puras e passa a atender a demanda por animais cruzados e em graus de sangue definidos, criando um novo mercado potencial para as tecnologias de embriões. No Brasil, estima-se uma demanda anual de 2 a 4 milhões de novilhas de reposição para rebanhos leiteiros, e a FIV pode ser uma alternativa valiosa para fornecer animais com maior potencial de produção para este segmento.



Outra tecnologia com grande potencial de impacto no mercado de embriões é a criopreservação. Os baixos resultados obtidos com o congelamento de embriões produzidos *in vitro* resulta em um baixo percentual de embriões FIV criopreservados (5 a 6% do total), ou seja, a maioria dos embriões ainda é transferida a fresco. Consequentemente, o uso da FIV é limitado pela disponibilidade, custo e logística dos rebanhos de receptoras. Da mesma forma, o comércio internacional de germoplasma bovino também é aquém da demanda efetiva. Os baixos resultados obtidos com embriões PIVE criopreservados no Brasil parecem estar diretamente relacionados a características inerentes aos embriões zebuínos, uma vez que taxas de gestação semelhantes tem sido obtidas após a descongelação de embriões produzidos *in vitro* ou *in vivo* em raças taurinas (Galli et al., 2001; Thibier, 2005).

CONCLUSÕES

A evolução no uso de tecnologias de embriões no Brasil, na última década, demonstra que o sucesso comercial de uma determinada tecnologia depende não apenas de sua eficiência relativa, mas também de fatores de mercado, do desenvolvimento de tecnologias associadas e do surgimento de novas aplicações potenciais. Por outro lado, a fertilização *in vitro* demonstra como o desenvolvimento tecnológico pode influenciar o setor produtivo, sendo portanto um exemplo interessante de inovação.

Agradecimentos

Ao comitê de estatística da SBTE, pelo fornecimento de dados relativos à produção de embriões.

Bibliográficas

- Blondin, P.; D. Bousquet; H. Twagiramungu; F. Barnes; M.A. Sirard. 2002. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 66(1): 38-43.
- Camargo, L.S.; C. Freitas; W.F. de Sa W.F.; A. de Moraes Ferreira; R.V. Serapiao; J.H. Viana. 2010. Gestation length, birth weight and offspring gender ratio of *in vitro*-produced Gyr (*Bos indicus*) cattle embryos. *Animal Reproduction Science* 120: 10-15.
- De Roover, R.; J.M. Feugang; P.E. Bols; G. Genicot; C.H. Hanzen. 2008. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle *in vitro* embryo production. *Reproduction in Domestic Animals* 43(2): 239-45
- Donnay, I.; A. Van Langendonck; P. Auquier; B. Grisart; A. Vansteenbrugge; A. Massip; F. Dessy. 1997. Effects of co-culture and embryo number on the *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenology* 47(8): 1549-61.
- Ferry, L.; P. Mermillod; A. Massip; F. Dessy. 1994. Bovine embryos cultured in serum-poor oviduct-conditioned medium need cooperation to reach the blastocyst stage. *Theriogenology* 42(3): 445-53.
- Figueiredo, R.A.; C.M. Barros; O.L. Pinheiro; J.M. Soler. 1997. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology* 47(8): 1489-505.
- Galli, C.; G. Crotti; C. Notari; P. Turini; R. Duchi; G. Lazzari. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 55(6): 1341-57.
- Hasler, J.F. 2003. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal Reprod. Science* 79(3-4): 245-64.

- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. Indicadores de produção. [Fonte: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria>]
- Lonergan, P.; T. Fair. 2008. *In vitro*-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* 69(1): 17-22.
- Lopes, A.S.; T. Martinussen; T. Greve; H. Callesen. 2006. Effect of days post-partum, breed and ovum pick-up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. *Reproduction in Domestic Animals* 41(3): 196-203.
- Merton, J.S.; A.P. de Roos; E. Mullaart; L. de Ruigh; L. Kaal; P.L. Vos; S. J. Dieleman. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 59(2): 651-74.
- Peterson, A.J.; R.S. Lee. 2003. Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology* 59(2): 687-97.
- Pontes, J.H.; I. Nonato-Junior; B.V. Sanches; J.C. Ereno-Junior; S. Uvo; T.R. Barreiros; J.A. Oliveira; J.F. Hasler; M.M. Seneda. 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 71(4): 690-7.
- Rizos, D. M. Clemente; P. Bermejo-Alvarez; J. de La Fuente; P. Lonergan; A. Gutiérrez-Adán. 2008. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals* 43(4): 44-50.
- Sartorelli, E.S.; L.M. Carvalho; D.R. Bergfelt; O.J. Ginther; C.M. Barros. 2005. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology* 63: 2382-94.
- Seneda, M.M.; C.R. Esper; J.M. Garcia; J.A. Oliveira; R. Vantini. 2001. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science* 67(1-2): 37-43.
- Siqueira, L.G.; C.A. Torres; E.D. Souza; P.L. Monteiro; E.K. Arashiro; L.S. Camargo; C.A. Fernandes; J.H. Viana. 2009. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. *Theriogenology* 72(7): 949-58.
- Stroud, B. 2011. Report to the President and the Board of Governors of the IETS: Statistics and Data Retrieval Committee. *Embryo Transfer Newsletter, December*.
- Thibier, M. 2001. The animal embryo transfer industry in figures. A report from the IETS Data Retrieval Committee. *Embryo Transfer Newsletter, December*.
- Thibier, M. 2005. The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reprod Nutr Dev* 45(3): 235-42.
- Viana, J.H., L.S. Camargo; A. De Moraes Ferreira; W.F. De Sa; C.A. De Carvalho-Fernandes, A. De Pinho Marques Junior. 2004. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Animal Reproduction Science* 84(1-2): 1-12.
- Viana, J.H.; M.P. Palhao; L.G. Siqueira; J.F. Fonseca; L.S. Camargo. 2010(a) Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology* 73(7): 966-72.
- Viana, J.H.; L.G. Siqueira; M.P. Palhao; L.S. Camargo. 2010 (b) Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. *Acta Scientiae Veterinariae* 38: 661-674.

