

X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

**Produção *in vitro* de embriões bovinos F1 a partir de doadoras de oócitos da raça Gir Leiteiro e Holandesa<sup>1</sup>**

Clara Slade Oliveira\*<sup>2</sup>, Raquel Varella Serapião\*<sup>3</sup>, Agostinho Jorge dos Reis Camargo<sup>4</sup>, Marcos Brandão Dias Ferreira<sup>5</sup>, Célio de Freitas<sup>6</sup> e Rui da Silva Verneque<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Apoio financeiro CNPq e Fapemig

<sup>2</sup>EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora. Email: clara.oliveira@embrapa.br

<sup>3</sup>PESAGRO-RIO, Niterói. Email: raquel@pesagro.rj.gov.br

<sup>4</sup>PESAGRO-RIO, Niterói. Email: agostinhocamargo@yahoo.com.br

<sup>5</sup>EPAMIG, Uberaba. Email: marcos.ferreira@epamig.com.br

<sup>6</sup>EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora. Email: celio.freitas@embrapa.br

<sup>7</sup>EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora. Email: rui.verneque@embrapa.br. Bolsista CNPq.

**Resumo:** Diferenças observadas entre raças Gir e Holandesa (HOL) podem afetar a produtividade dos sistemas de produção *in vitro* de embriões (PIVE). O objetivo deste estudo foi comparar a utilização de doadoras de oócitos Gir e HOL visando à produção de fêmeas F1. Para tanto, 178 punções foliculares guiadas por ultrassonografia foram realizadas em 16 repetições, totalizando 1650 oócitos recuperados. Estes foram classificados, e as estruturas viáveis (GI, GII e GIII) foram utilizadas para PIVE. Observou-se redução ( $p < 0.05$ ) no número de estruturas GII do grupo HOL em relação à Gir (GIR 2,49±0,25, HOL 1,30±0,15) e GIII (GIR 4,21±0,43, HOL 2,01±0,23), no número de oócitos viáveis por sessão (GIR: 8,94±0,69; HOL: 4,20±0,33), e na taxa de oócitos viáveis (GIR: 74,73%; HOL: 62,07). Não houve diferença ( $P > 0.05$ ) na taxa de blastocistos produzidos (GIR: 45,19; HOL: 41,56). Porém, o número de blastocistos produzidos por sessão foi superior ( $P < 0.05$ ) no grupo GIR (GIR: 3,34±0,35; HOL: 1,36±0,15). As taxas de prenhez aos 30 dias (GIR:47,95; HOL:41,53) e 60 dias (GIR:42,95; HOL:33,84) não diferiram ( $P > 0.05$ ) entre os grupos. Portanto, os índices da PIVE de animais F1 em regiões de clima tropical são superiores utilizando-se matrizes Gir quando comparadas a matrizes da raça Holandesa. No entanto, o desempenho dos animais produzidos pode também influenciar a decisão do uso de doadoras Gir ou Holandesa.

**Palavras-chave:** punção folicular, fertilização *in vitro*, contribuição materna, Girolando, prenhez

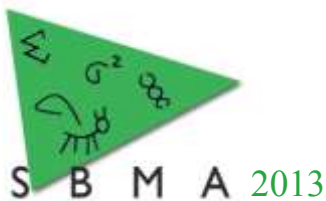
**In vitro production of bovine F1 embryos using Gir and Holstein breeds as oocyte donors**

**Abstract:** Differences observed among Gir and Holstein (HOL) dams can affect *in vitro* production of embryos (IVPE) systems in terms of productivity. The objective of this study was to compare GIR and HOL dams as oocyte donors aiming the production of F1 heifers. For that, 178 ultrasound guided ovum pick-ups were performed in 16 replicates, totaling 1650 recovered oocytes. Oocytes were classified, and viable structures (GI, GII and GIII) were used for IVPE. A decrease ( $p < 0.05$ ) was observed in HOL group regarding the number of GII (GIR 2,49±0,25, HOL 1,30±0,15) and GIII (GIR 4,21±0,43, HOL 2,01±0,23) structures, the number of viable oocytes per procedure (GIR: 8,94±0,69; HOL: 4,20±0,33) and the rate of viable oocytes per procedure (GIR: 74,73; HOL: 62,07). No difference ( $P > 0.05$ ) was detected in the blastocyst rate (GIR: 45,19; HOL: 41,56). However, an increase ( $P < 0.05$ ) in the number of blastocysts per procedure was observed in GIR group (GIR: 3,34±0,35; HOL: 1,36±0,15). Pregnancy rates remained unaltered ( $P > 0.05$ ) between groups 30 days after transfer (GIR:47,95; HOL:41,53) and 60 days after transfer (GIR:42,95; HOL:33,84). Therefore, IVPE rates aiming the production of F1 heifers in tropical climate regions are increased when Gir dams are used comparing to Holstein dams. However, performance of F1 heifers can also influence the decision between Gir and Holstein breeds as oocyte donors.

**Keywords:** ovum pick-up, *in vitro* fertilization, maternal contribution, Girolando, pregnancy

**Introdução**

A produção de bezerras F1 pelo cruzamento das raças Gir Leiteiro e Holandesa (HOL) é um importante segmento da cadeia produtiva do leite, agregando aos produtos características de rusticidade e produção leiteira. Com o advento do sêmen sexado, o uso da biotécnica de produção *in vitro* de embriões



## X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

(PIVE) vem se consolidando como importante ferramenta para produção de animais F1, por possibilitar o aumento em número dos produtos gerados a partir de matrizes puras de interesse zootécnico, além da fixação do grau de sangue desejado em cruzamento. Apesar das diferenças observadas entre as raças, ambas são exploradas como doadoras para a produção de blastocistos e prenhez F1. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi comparar a produtividade da técnica de PIVE utilizando matrizes Gir e HOL.

### Material e Métodos

Entre os meses de fevereiro e novembro de 2012, foram realizadas 178 punções foliculares guiadas por ultrassonografia (PF) para obtenção de oócitos destinados à PIVE, em 16 replicatas, totalizando 1650 oócitos recuperados, dos quais 1037 eram viáveis. Foram utilizadas simultaneamente matrizes Gir, cujos oócitos viáveis foram fertilizados com sêmen de touro da raça Holandesa (GIR, n=694), e matrizes da raça Holandesa, cujos oócitos viáveis foram fertilizados com sêmen de touro Gir Leiteiro (HOL, n=343). Para tanto, folículos de 2 a 8 mm foram aspirados, e os complexos *cumulus*-oócito classificados de acordo com o citoplasma e número de camadas de células do *cumulus*, em: viáveis (GI: mais de 3 camadas e citoplasma homogêneo/ GII: mais de 3 camadas e citoplasma com granulações; ou menos de 3 camadas e citoplasma homogêneo/ GIII: menos de 3 camadas e citoplasma com granulações; ou parcialmente desnudos e citoplasma homogêneo ou com leves granulações) e não viáveis (GIV: parcialmente desnudos e citoplasma com granulações; ou desnudos; ou expandidos; ou degenerados). Os oócitos viáveis foram maturados *in vitro* (MIV) em meio TCM 199, suplementado com 10% SFB e 1,0µg/mL FSH (Pluset®, Calier), 50µg/mL hCG (Profasi®, Serono), 1,0µg/mL estradiol (Sigma E-2758), 0,2mM piruvato de sódio e 83,4µg/mL amicacina. Após a MIV, espermatozoides viáveis de palhetas congeladas de sêmen sexado foram separados por gradiente de Percoll descontínuo e a fertilização *in vitro* (FIV) foi realizada em meio TALP-FIV, com 0,2mM piruvato, 83,4µg/mL amicacina e suplementado com 6mg/mL de BSA. O cultivo *in vitro* (CIV) foi realizado em meio SOF suplementado com 2,5% SFB por 7 dias. Todas as etapas da PIVE foram realizadas em estufa incubadora a 38,5°C, em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e alta umidade relativa. A taxa de clivagem foi avaliada 96h após a FIV, e a taxa de blastocisto no dia 7. As prenhez foram produzidas pela transferência de blastocistos grau I no dia 7 para receptoras com estro sincronizado pela utilização de protocolo hormonal com progesterona, benzoato e cipionato de estradiol, e cloprostenol. As médias de estruturas recuperadas classificadas em GI-GIV foram comparadas por raça pelo teste Kruskal-Wallis e Dunn. A comparação entre raças em cada categoria, a média de oócitos viáveis e o número de blastocistos produzidos por sessão foi comparado pelo teste Mann Whitney. As taxas de oócitos viáveis, embriões clivados, blastocistos, prenhez aos 30 e 60 dias, e nascimento de machos, foram comparadas pelo teste Qui-quadrado. A média de duração da gestação foi analisada pelo Teste T. Todas as análises foram realizadas no programa Instat em nível de significância de 5%.

### Resultados e Discussão

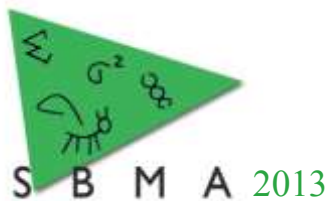
A quantidade total de oócitos obtida no presente experimento foi de 609 para o grupo HOL e 1041 para o grupo GIR (Tabela 1). A classificação das estruturas demonstrou que no grupo GIR, a presença de oócitos GII, GIII e GIV foi superior a de oócitos GI. No grupo HOL, a obtenção de oócitos GIV foi superior a de oócitos GI e GII, e as categorias GII e GIII foram superiores a GI. Ainda, observou-se uma redução no número de estruturas GII e GIII em oócitos HOL, o que refletiu sobre o número de oócitos viáveis e a taxa de oócitos viáveis, inferiores no grupo HOL. Portanto, observa-se que no grupo HOL tanto a qualidade quanto a quantidade de oócitos obtidos foram inferiores ao grupo GIR.

Tabela 1. Média ( $\pm$ EP) do número de oócitos grau GI, GII, GIII e GIV coletados por sessão de punção folicular ovariana e número e percentual de oócitos viáveis nos grupos GIR e HOL.

| Grupo | GI                           | GII                           | GIII                           | GIV                          | Oócitos Viáveis (V) | Taxa de Viáveis |
|-------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------|-----------------|
| GIR   | 1,40 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup> | 2,49 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup>  | 4,21 $\pm$ 0,43 <sup>b</sup>   | 3,05 $\pm$ 0,43 <sup>b</sup> | 8,94 $\pm$ 0,69     | 74,73           |
| HOL   | 0,87 $\pm$ 0,17 <sup>A</sup> | 1,30 $\pm$ 0,15 <sup>B*</sup> | 2,01 $\pm$ 0,23 <sup>BC*</sup> | 2,57 $\pm$ 0,24 <sup>C</sup> | 4,20 $\pm$ 0,33*    | 62,07**         |

<sup>ab/ABC</sup> Médias indicadas com letras distintas entre linhas diferem (Kruskal-Wallis e Dunn).

Asteriscos representam médias diferentes entre colunas (\*Mann Whitney e \*\*Qui-quadrado).



## X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Dos óocitos obtidos, 1037 foram submetidos à fertilização (Tabela 2). Observa-se que a taxa de clivagem dos prováveis zigotos foi mais baixa no grupo HOL, sugerindo que a qualidade dos óocitos fertilizados seja inferior neste grupo, ou que a qualidade do sêmen utilizado seja diferente entre os grupos.

Tabela 2. Produção de embriões F1 e gestações a partir de óocitos de doadoras GIR e HOL.

| Raça | Embriões clivados%(n) | Blastocistos %(n) | Blastocistos por sessão (média±EP) | Prenhezes 30 dias%(n) | Prenhezes 60 dias%(n) | Nascimentos de machos % (n) | Duração da gestação (média±DP) |
|------|-----------------------|-------------------|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| GIR  | 80,97 (562/694)       | 45,19 (254/562)   | 3,34±0,35                          | 47,18 (67/142)        | 42,95 (61/142)        | 8,11 (3/37)                 | 280,81±5,41                    |
| HOL  | 74,34* (255/343)      | 41,56 (106/255)   | 1,36±0,15*                         | 41,53 (27/65)         | 33,84 (22/65)         | 14,29 (2/14)                | 287,33±4,33*                   |

A taxa de blastocistos foi avaliada considerando óocitos clivados. Os percentuais foram analisados por Qui-quadrado e a duração da gestação Teste T ( $p=0.05$ ), e asteriscos indicam médias diferentes.

Não houve diferença entre grupos no percentual de embriões produzidos. Porém, o número total de blastocistos produzidos foi 2,39 vezes maior no grupo GIR, e as médias de embriões produzidos por sessão foram superiores no grupo GIR. Foram transferidos 207 embriões, em função da disponibilidade de receptoras. As taxas de prenhez aos 30 e 60 dias e o percentual de nascimento de bezerros machos não diferiram entre os grupos, apesar de terem sido numericamente superiores no grupo GIR. A duração da gestação foi avaliada englobando prenhezes de anos anteriores, totalizando 160 gestações de fêmeas a partir de embriões produzidos por PIVE e por superovulação, cujos dados foram agrupados por não diferirem entre si. A duração da gestação foi 6,52 dias superior no grupo HOL, sugerido efeito de contribuição materna ou paterna sobre este parâmetro.

### Conclusões

O presente estudo demonstrou que a produção de animais F1 em regiões de clima tropical apresenta melhor desempenho utilizando-se matrizes GIR quando comparada a matrizes HOL. Este resultado se deve principalmente ao número superior de óocitos totais, além do maior percentual de óocitos viáveis obtidos por sessão. O desempenho dos indivíduos gerados não foi abordado neste trabalho, e pode influenciar a decisão do uso de doadoras das raças Holandesa ou Gir.

### Agradecimentos

Os autores agradecem a equipe do Campo Experimental Santa Mônica pelo auxílio prestado na realização do estudo.

### Referências Bibliográficas

- FREITAS, C.; VIANA, J.H.M.; PALHÃO, M.P.; NOGUEIRA, L.A.G. Use of different animal categories as embryo recipients in bovine. In: 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro. Proceedings ICAR 2004, v.1. p.394-394.
- GHETTI, A.M.; SOUZA, E.D.; CAMPOS JUNIOR, P.H.A. et al. Avaliação de cultivo overnight como estratégia para a coleta e transferência a fresco de embriões F1 Holandês/Gir em rebanhos diferentes. In.: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 46., 2009, Maringá. Anais... São Paulo: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2009. (CD-ROM).
- HASTER, J.F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, v.56, p.1401-1415, 2001.
- 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*, 74(8), p.1349-1355, 2006.
- VIANA, J.H.M., CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, p.915-919, 2007.
- VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in Zebu cattle. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.12, p.2501-2509, 2000.
- WHEELER, M.B.; RUTLEDGE, J.J.; FICHER-BROWN, A. et al. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology*, 65(1), p. 219-227, 2006