

AVANÇOS NA BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DOS BOVINOS

R. Rumpf¹, M.A.N. Dode², A.E.D. Feliciano Silva¹

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Caixa Postal 02372

70770-900 – Brasília, DF

²Embrapa Gado de Corte

E-mail: rodolfo@cenargen.embrapa.br

A oferta suficiente de alimentos saudáveis, a prevenção e controle de enfermidades e a sobrevivência harmoniosa do homem nos diferentes ecossistemas é sem dúvida o maior desafio da ciência na atualidade. O investimento na biotecnologia de ponta em produção animal no Brasil é respaldado por dois principais fatos. O primeiro, é o fato que o Brasil ainda lidera a lista dos países com maior biodiversidade e o segundo, é que o mercado interno por carne e leite é o terceiro maior mercado potencial do mundo. Seguramente os genes serão a moeda forte do futuro, mas do que adianta possuí-los se não for possível identificá-los e torná-los disponíveis para a sociedade ?

Os recursos genéticos animais, tanto domésticos como silvestres, comerciais ou em vias de extinção já constituem um dos mais promissores segmentos da economia nacional. Eles representam um nicho capaz de responder rapidamente a investimentos pontuais. Portanto, o que hoje parece distante e utópico do ponto de vista de aplicabilidade pode se tornar uma realidade amanhã, já que o elemento determinante na relação custo/benefício das modernas técnicas de multiplicação animal é o mérito genético do material a ser multiplicado. Neste contexto, fica evidente ainda, a necessidade cada vez maior de interação dos diferentes segmentos da produção animal a fim de atender os aspectos inter e multidisciplinares. Os marcadores genéticos; a formação de bancos de sêmen, óvulos, embriões e folículos; a sexagem do sêmen; a transferência de embriões; a identificação do sexo do embrião; a produção “in vitro” de embriões; a clonagem; e a própria transgenia são “ferramentas” disponíveis aos programas de melhoramento e conservação de recursos genéticos animais.

É importante salientar, que em se tratando de técnica de multiplicação deve-se buscar a melhoria constante dos índices técnicos, o monitoramento do desenvolvimento e uso da tecnologia (Carmo et al., 1999; Luna et al., 1999), bem como a identificação de parâmetros cada vez mais eficientes de seleção das doadoras de ovócitos e embriões (Luna et al., 1997) e dos doadores de sêmen (Bellin et al., 1994; Silva, 1998).

TECNOLOGIA DE SÊMEN

A expansão da inseminação artificial (IA) no Brasil está mais relacionada à estruturação do serviço à nível de fazendas do que ao processamento do sêmen em si. O fato de existir tecnologia disponível ainda não garante a qualidade do sêmen efetivamente disponibilizado. Só a pressão das associações de classe e consumidores conscientes e informados poderão melhorar o panorama atual.

A criopreservação de sêmen têm apresentado apenas pequenas adaptações dos métodos clássicos já amplamente difundidos. No entanto, não se descarta a possibilidade de surgimento de novas alternativas sobretudo para a congelação de sêmen manipulado ou de células da linhagem espermatogênica.

Existe uma demanda no sentido de buscar novas alternativas que avaliem a funcionalidade da célula espermática e que possam prever com maior segurança a fertilidade de um reprodutor. Com esse objetivo, testes como o de reação acrossômica induzida (Silva, 1998), o de ligação à zona pelúcida e o de penetração ovocitária (Fazelli et al., 1993) tem sido desenvolvidos. Além disso, já foram identificadas no sêmen proteínas associadas a capacidade fecundante dos espermatozoides, que permitem um melhor diagnóstico em relação a fertilidade de um touro. Essas proteínas, poderão também ser utilizadas como potencializadoras da motilidade e estimuladoras da reação acrossômica, fatores essenciais para a fecundação *in vivo* e *in vitro* (Bellin et al., 1994).

O domínio da seleção do sexo do germoplasma masculino constitui o grande desafio da pesquisa em processamento de sêmen dos próximos anos. A sexagem permitirá, sem dúvida, um maior ganho genético, eficiência de produção e maior flexibilidade no manejo do rebanho, bem como a preservação de fêmeas ou machos dependendo da demanda do mercado, resultando num maior ganho econômico. Atualmente, conhecendo-se a diferença do conteúdo de DNA na célula carreadora do cromossoma X ou Y, pode-se separar os mesmos por fluocitometria com 90% de acurácia, obtendo-se o sexo desejado (Seidel e Johnson , 1999). Projeta-se para essa técnica um maior uso na produção *in vitro* de embriões do que na inseminação artificial em bovinos (Seidel et al., 1998). Outros métodos fundamentados nas diferenças de densidade, peso, carga elétrica, conteúdo protéico e propriedade imunológica, estão sendo estudadas e poderão se constituir em outras alternativas para a sexagem de sêmen. Entretanto, para a inseminação em larga escala, existem muitos obstáculos a serem vencidos, como o tempo de separação, viabilidade e número de espermatozoides por dose inseminante, diluidores específicos para permitir o transporte e preservação do sêmen sexado, além do custo da dose inseminante.

TECNOLOGIA DE EMBRIÕES

Na transferência de embriões (TE) os esforços se concentram no desenvolvimento de novos protocolos de indução da ovulação múltipla a partir de uma nova geração de hormônios (mais purificados) e informações básicas sobre a foliculogênese (Macmillan, 1999; Fortune and Rivera, 1999; Caccia, et al., 2000). A manipulação da dieta das doadoras é também uma alternativa para melhorar as respostas da TE e diminuir os custos (Cavaliere et al., 1999). O objetivo é duplicar as atuais taxas médias de 2 a 3 gestações/coleta e aumentar a frequência de coletas para 6 a 8 por ano.

A produção *in vitro* de embriões (PIV) vem apresentando avanços consideráveis e esta sendo lentamente incorporada aos projetos de produção. Com o desenvolvimento do método de punção folicular, tornou-se possível a recuperação de ovócitos de fêmeas vivas para fecundação *in vitro* (FIV), abrindo novos caminhos para multiplicação de animais de interesse econômico superando os atuais índices da TE clássica, no que diz respeito a produção de bezerro/vaca/ano. Essa técnica pode ser utilizada em animais jovens, gestantes ou lactantes e

com problemas de infertilidade adquiridos (Tervit, 1996; Goodhand et al., 1999; Malard et al., 1999; Taneja et al., 2000). Sendo que a utilização de bezerras como doadoras de ovócitos em programas de TE oferece um potencial considerável para acelerar o ganho genético através de redução do intervalo entre gerações (Lohuis, 1995; Taneja et al., 2000). Além disso, possibilita a oferta constante de embriões F1 seja para os programas de produção de leite ou de carne.

A média de ovócitos viáveis obtidos por sessão de punção depende da estratégia adotada. Assim é possível puncionar os folículos de uma doadora duas vezes por semana, uma vez por semana ou uma vez a cada duas semanas, sendo que, nas duas últimas alternativas é possível melhorar os resultados mediante a estimulação hormonal. Independente da estratégia, o resultado final esperado é de pelo menos uma gestação por semana por doadora (Peixer, et al., 1996; Hasler, 1996; Bols, 1997; Nibart et al., 1997; Rodrigues & Garcia, 1998; Sauvé, 1998; Goodhand et al., 1999; Bousquet, et al., 2000). Estes resultados estão vinculados às condições clínicas das doadoras, já que boa parte dos animais submetidos a PIV são animais com problemas de fertilidade adquiridos.

Apesar dos avanços obtidos, a produção *in vitro* de embriões ainda apresenta algumas limitações tais como os baixos índices de blastocisto, dificuldade na criopreservação dos embriões, menor viabilidade dos ovócitos obtidos de bezerras em relação aos de vacas e novilhas, e o custo do embrião que é mais alto do que um embrião de TE. Além disso, bezerros com maior peso ao nascer, período de gestação mais longo, aumento na incidência de abortos, aumento da mortalidade perinatal e aumento de anormalidades congênitas tem sido associados a prenhez produzidas por transferência de embriões produzidos *in vitro* (Leibfried-Rutledge, 1999; Wagtendonk de Leew et al., 2000).

O uso comercial em larga escala dessa técnica está portanto, vinculada a melhoria dos índices técnicos e conseqüentemente a diminuição dos custos. Tendo em vista que a aspiração pode ser feita à campo, enquanto a FIV requer laboratório adequado, a tendência é que ocorra, no Brasil, o mesmo que em outros países como Alemanha, França e Canadá, onde existem laboratórios regionais de FIV que recebem os ovócito aspirados por veterinários que atuam a nível de fazendas. No laboratório é produzido o embrião *in vitro* que é entregue ao veterinário que o transferirá para vacas receptoras que levarão a gestação a termo.

Outro método para otimizar a utilização das fêmeas de interesse se refere ao isolamento e cultivo de folículos pré-antrais (FOPA) (Figueiredo et al., 1993). Os FOPAs representam 90% da população de folículos ovarianos, sendo que a grande maioria degenera e não chega até ovulação. A potencialidade dessa técnica se sustenta nos milhares de ovócitos que podem ser recuperados de um único ovário ou de partes do ovário, podendo ser utilizado como fonte de ovócitos para FIV ou para outras biotécnicas (Lucci et al., 1999). A coleta de tecido ovariano pode ser feita em qualquer idade, estágio do ciclo ou mesmo de animais que morrem subitamente, podendo-se obter grande número de ovócitos de qualquer fêmea (Shaw et al., 2000). Como fonte de ovócitos, os FOPAs devem ser cultivados *in vitro* até a ovulação, ou o tecido ovariano podem ser transplantado para ovário de doadora da mesma espécie, ou para uma receptora imuno-compatível.

A criopreservação de embriões depende fundamentalmente do estágio de desenvolvimento e qualidade morfológica dos mesmos. A introdução do etilenoglicol como crioprotetor viabilizou a transferência direta, onde a remoção do etilenoglicol ocorre no útero da receptora,

sem alterar os resultados até então obtidos com o glicerol (Zanenga & Pedroso, 1997). A expectativa hoje se volta para a criopreservação dos embriões pela vitrificação com a transferência direta. Os resultados, embora ainda preliminares são promissores e seguramente em breve será possível contar com mais esta tecnologia (Dattena et al., 2000). A criopreservação de ovócitos continua sendo um desafio para a pesquisa, sendo que os melhores resultados também estão relacionados a vitrificação (Vajta, et al., 1998).

A micromanipulação de embriões seja para diagnósticos pré-implantação (identificação do sexo p.e.), seja a própria bipartição visando a produção de gêmeos homozigóticos, depende igualmente do estágio de desenvolvimento e qualidade morfológica do embrião e do treinamento do técnico. Essas técnicas estão estabelecidas e disponíveis ao setor privado.

A injeção intracitoplasmática de espermatozóide (IICE) é uma técnica amplamente difundida na reprodução assistida humana, mas com resultados ainda baixos em bovinos, embora o primeiro bezerro tenha nascido em 1991(Goto et al., 1991). Atualmente, através da IICE, o uso das células espermiogênicas primordiais e espermatozoides do parênquima testicular e epididimário, podem ser a opção e garantia biológica para a preservação de material de alto valor genético, de reprodutores de idade avançada, e em perigo de extinção. Também a possibilidade de transferência interespecífica de células primordiais e produção da espermatogênese entre espécies como camundongos e ratos (xenogênica) pode se tornar uma realidade nos animais domésticos.

A Transferência Nuclear para a produção de clones em mamíferos, está sendo implantada em alguns laboratórios do Brasil que vem trabalhando com FIV. Embora a fonte clássica de células doadoras de núcleos seja mórulas produzidas *in vivo* ou *in vitro*, o estabelecimento de linhagens celulares a partir de células tronco embrionárias e fibroblastos fetais (Garcia et al., 1998; Oliveira, et al.,1999), bem como células espermatogênicas (Feliciano Silva et al., 1998) está sendo perseguido.

A transferência nuclear está sendo implantada e desenvolvida com os objetivos de modelo científico para diferentes estudos básicos, regeneração de raças/espécies em vias de extinção, melhoramento animal, e sem dúvida, com o objetivo de dar suporte a produção de animais transgênicos.

As tecnologias relatadas, independente de seu estágio de desenvolvimento, constituem a caixa de ferramentas tecnológicas disponíveis para atender as demandas do setor produtivo. Essas tecnologias são aditivas e não substitutivas, e a estratégia de uso das mesmas está diretamente relacionada ao mérito genético dos doadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELLIN, M.E., HAWKINS, H.E., AX. R.L. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. *J. Anim. Sci.*, New York, v.72, p.2441-2448,1994.
- BOLS, P.E.J. *Transvaginal ovum pick-up in the cow; technical and biological modifications*. Merelbeke: Universidade de Gent, 1997. 228p. (Tese de Doutorado).

- BOUSQUET, D., TWAGIRAMUNGU, H., DUROCHER, J. et al. Effect of LH injection before ovum pick-up on in vitro embryo production with oocytes collected at different intervals after the last FSH injection. *Theriogenology*, Gainesville, v.53, p.347, 2000.
- CACCIA, M., TRÍBULO, R., TRÍBULO, H. et al. Effect of pretreatment with eCG on superovulatory response in CIDR-B-treated beef cattle. *Theriogenology*, Gainesville, v.53, p.495, 2000.
- CARMO, T.F.M., LUNA, H.S., LUNA, H. Efeito da superovulação na instabilidade cromossômica de novilhas. *Gen. Mol. Biol.*, São Paulo, v.22, n.3, p.51, 1999 (Supl.).
- CAVALIERI, F.L.B. *Efeito de flushing nutricional associado ou não ao bst e de dois níveis de concentrado no crescimento folicular, resposta superovulatória e produção de embriões em vacas de corte*. Maringá: Escola de Zootecnia da UEM, 2000. 70p. (Dissertação. Mestrado em Zootecnia).
- DATTENA, M., PTAK, G., LOI, P. et al. Lambing rate following transfer after vitrification of in-vitro and in-vivo-produced ovine embryos. *Theriogenology*, Gainesville, v.53, p.252, 2000.
- FAZELI, A.R., STEENWEG, W., BEVERS, M.M. et al. Development of the sperm zona pellucida binding assay for bull semen. *Vet. Rec.*, London, v.132, p.14-16, 1993.
- FELICIANO SILVA, A.E.D., SILVEIRA, L.L., OLIVEIRA, R.R. et al. Isolation and identification of spermatogenic cells as factor potentially used in animal genetic preservation. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, v. 26, n. 1, p. 259, 1998.
- FIGUEIREDO, J.R., HULSHOF, S.C.J., VAN DEN HURK, R. et al. Development of a new mechanical and enzymatic method for isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. *Theriogenology*, Gainesville, v.40, p.789-799, 1993.
- FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M. Persistent dominant follicles in cattle: Basic and applied aspects. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre. v.7, n 1, p.24-36, 1999 (Supl.).
- GARCIA, J.M., WOLF, A., SMITH, L.C. Obtenção e caracterização de embryonic stem cells bovina: resultados preliminares. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, v.26, n.1, p.282, 1998 (Supl.).
- GOODHAND, K.L., WATT, R.G., STAINES, M.E. et al. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*, Gainesville, v.51, p.951-961, 1999.
- GOTO, K., KINOSHITA, Y., TAKUMA E. et al. Birth of calves after the transfer of oocytes fertilized by sperm injection. *Theriogenology*, Gainesville, v.35, p.205, 1991 (Abstr.).
- HASLER, J.F. Commercial production of in vitro derived bovine embryos. *Arq. Fac. Vet. UFRS*, Porto Alegre, v. 24, n.1, p.117-134, 1996.
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. Factors determining competence of in vitro produced cattle embryos. *Theriogenology*, Gainesville, v.51, p.473-485, 1999.
- LOHUIS, M.M. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. *Theriogenology*, Gainesville, v.43, p.51-60, 1995.
- LUCCI, C.M., RUMPF, R., FIGUEIREDO, J.R. et al. Isolation of ovarian preantral follicles from zebu cows: development and efficiency of a specific mechanical. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, v.27, n.1, p.240, 1999 (Abst.).
- LUNA, H.S., LUNA, H., RUMPF, R. Estudo da instabilidade cromossômica em bovinos sub-férteis. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, v.25, n.11, p.244, 1997 (Supl.).
- LUNA, H.S., RUMPF, R., LUNA, H. et al. Alterações cromossômicas em ovócitos bovinos maturados in vitro. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, v.27, n.14, p.252, 1999 (Supl.).

- MACMILLAN, K.L. Pharmacological control of the oestrous cycle to improve the reproductive performance of cattle. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.23, n.2, p.61-64, 1999.
- MALARD, P. F., CORDEIRO, D. M., PEIXER, M. A S. et al. Índice de recuperação, qualidade e potencial de desenvolvimento de ovócitos de bezerras zebuínas de 2 a 4 meses de idade; resultados preliminares. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, v. 27, p. 256, 1999.
- NIBART, M., MARQUANT, B., HUMBLLOT, P. The application of new reproductive technologies in France. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, v. 25, n.1, p.21-35, 1997.
- OLIVEIRA, R.R., RUMPF, R., LUNA, H.S. et al. Isolamento, cultivo e criopreservação de fibroblastos fetais bovinos. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE - SIRGEALC, 2., 1999, Brasília. *Anais...Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, 1999. CD-ROM. Editado por Arthur da Silva Mariante e Patrícia Goulart Bustamante.
- PEIXER, M.A.S., RUMPF, R., de BEM, A.R. et al. Produção de embriões e gestações a partir de ovócitos recuperados por ultrasonografia em fêmeas super-ovuladas. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, v.24, n.1, p.231, 1996.
- RODRIGUES, C., GARCIA, J.M. The application of ultrasound guided follicular aspiration in cattle. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, v. 26, n.1, p.156-159, 1998.
- SAUVÉ, R. Ultrasound guided follicular aspiration and in vitro fertilization. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, v. 26, n.1, p.141-155, 1998.
- SEIDEL G. E., JOHNSON L.A. Sexing mammalian sperm; overview. *Theriogenology*, Gainesville, v.52, p.1267-1272, 1999.
- SEIDEL, JR. G.E., HERICKHOFF, L.A., SCHENK, J.L. et al. Artificial insemination of heifers with cooled, unfrozen sexed semen. *Theriogenology*, Gainesville, v.49, p.365, 1998 (Supl.).
- SHAW, J.M., ORANRATNACHAI, A., TROUSON, A.O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, Gainesville, v.53, n.1, p.59-72, 2000.
- SILVA, A.E.F. Reação acrossômica induzida: Método indicador de fertilidade de touros. In: *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Brasília: Embrapa, 1998. 38p. (Embrapa/Cenargen. Documentos, 35).
- TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; VELDE, V. Development competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal, variation and repeated gonadotropin stimulation. *Bio. Reprod.*, Champaign, v.62, p.206-213, 2000.
- TERVIT, H.R. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim. Reprod. Sci.*, Amsterdam, v.42, p.227-238, 1996.
- VAJTA, G., HOLM, P., KUWAYAMA, M. et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to avoid cryoinjuries of mammalian ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, Champaign, v.51, p.53-58, 1998.
- WAGTENDONK-DELEEUW, A.M., MULAART, E., DE ROOS, J.S. et al. Effects of different reproduction techniques: al, moet or ivp, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology*, Gainesville, v.53, n.2, p.575-597, 2000
- ZANENGA, C.A., PEDROSO, M.F. Comparison between the pregnancy rates of frozen bovine embryos with glycerol or ethylene glycol. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, v.25, n.1, p.145-146, 1997 (Supl.)