

Recuperação de oócitos por aspiração folicular e análise da produção in vitro de embriões em *Bos indicus* das raças Gir e Nelore

João Filipi Scheffer Pereira ^{1*}

Maurício Barros Fernandes²

Saulo Henrique Weber ¹

Cristina Santos Sotomaior ¹

Oocytes recovery by follicular aspiration and analysis of in vitro embryo production in Gir and Nelore breeds (Bos indicus)

¹ Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), Curitiba, PR, Brasil

² Prófv Genética Animal Ltda, São José do Rio Preto, SP, Brasil

*Correspondência: joao.filipi@gmail.com

Recebido: 4 mar 2024 | Aceito: 16 abr 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.7213/acad.2024.22002>

Rev. Acad. Ciênc. Anim. 2024;22:e22002

Resumo

Objetivou-se analisar por meio de estudo retrospectivo a relação entre o número de oócitos, número de embriões, taxa de embriões de sessões de aspiração folicular (OPU) e produção in vitro de embriões (PIVE) de vacas doadoras das raças Gir e Nelore. Analisaram-se dados de 4.238 sessões de OPU/PIVE realizadas em doadoras Gir ($n = 1.115$) e Nelore ($n = 3.123$), entre os anos de 2008 e 2010. As variáveis analisadas foram número de oócitos viáveis, número e taxa de embriões

e percentual de sessões OPU/PIVE que não produziram embriões na PIVE. Tais variáveis foram divididas em quartis, de acordo com o número de oócitos. Utilizou-se o teste ANOVA para a comparação de médias das variáveis analisadas entre raças e quartis, com teste de homogeneidade de variância de Levene, seguido pelo teste de Bonferroni. O teste qui-quadrado foi utilizado para comparar o percentual de sessões OPU que não produziram embriões na PIVE. Em todas as análises considerou-se nível de significância de 5%. Na comparação entre as raças, a Nelore apresentou maior média ($p < 0,001$) para número de oócitos, número de embriões e taxa de embriões, e menor percentual ($p < 0,001$) de sessões OPU/PIVE que não produziram embriões em comparação com a raça Gir. Na análise por quartis, houve aumento ($p < 0,05$) no número médio de oócitos e de embriões do quartil inferior para o superior dentro de cada raça. Na comparação dos quartis entre as raças, a raça Nelore apresentou valores superiores ($p < 0,05$) no número de oócitos, de embriões e na taxa de embriões em todos os quartis. O percentual de sessões de OPU/PIVE que não produziram embriões reduziu significativamente ($p < 0,05$) à medida que o número de oócitos aumentou nos quartis. Em conclusão, a raça Nelore apresentou maiores médias de oócitos, embriões e taxa de embriões em comparação à raça Gir. O número e percentual de sessões que não produziram embriões foram menores na raça Nelore. O maior número de oócitos reflete no aumento do número de embriões e na redução do número e percentual de sessões de OPU que não produziram embriões.

Palavras-chave: Embriões in vitro. Gir. Nelore. Oócitos.

Abstract

We aimed to analyze, through a retrospective study, the relationship between the number of oocytes, number of embryos, embryo rate from follicular aspiration sessions (OPU), and in vitro embryo production (IVEP) from donor cows of the Gir and Nelore breeds. Data from 4,238 OPU/PIVE sessions performed on donors of the Gir ($n = 1,115$) and Nelore ($n = 3,123$) breeds, between 2008 and 2010, were analyzed. The variables analyzed were the number of viable oocytes, number of embryos, rate of embryos and the percentage of OPU/IVEP sessions that did not produce embryos in PIVE. Such variables were divided into quartiles by the number of oocytes. ANOVA was used to compare means between breeds and quartiles, with Levene's test of homogeneity of variance, followed by the Bonferroni test. The chi-square test was used to compare the percentage of OPU sessions that did not produce embryos in PIVE. In all analyzes a significance level of 5% was considered. In the comparison between breeds, the Nelore breed presented a higher average ($p < 0.001$) for number of oocytes, number of embryos and embryo rate, and a lower percentage ($p < 0.001$) of OPU/IVEP sessions that did not produce embryos compared to the Gir breed. In the analysis by quartiles, there was an increase ($p < 0.05$) in the average number of oocytes and embryos from the lower quartile to the upper quartile, within each breed. When comparing quartiles between breeds, the Nelore breed presented higher values ($p < 0.05$) in the number of oocytes, embryos and embryo rate in all quartiles. The percentage of OPU/IVEP sessions that did not produce embryos reduced significantly ($p < 0.05$) as the number of oocytes increased in the quartiles. In conclusion, the Nelore breed presented higher averages of oocytes, embryos and embryo rate compared to the Gir breed. The number and percentage of sessions that did not produce embryos were lower in the Nelore breed. The greater number of oocytes reflected an increase in the number of embryos, and a reduction in the number and percentage of OPU sessions that did not produce embryos.

Keywords: *In vitro* embryos. Gir. Nelore. Oocytes.

Introdução

A produção in vitro de embriões (PIVE) é uma biotecnologia aplicada com a finalidade de promover o

incremento genético materno nos rebanhos comerciais e de elite, principalmente pelo número de progênies/doadora/ano e pela otimização do sêmen sexado no processo de fertilização in vitro (Pontes et al., 2010).

O Brasil é o segundo maior produtor de embriões bovinos in vitro, representando 34,8% da produção global de embriões (Viana, 2018). As raças zebuínas foram a base do desenvolvimento desta biotecnologia no Brasil, com predomínio de animais adaptados ao clima e de características reprodutivas que beneficiam a PIVE, como o alto número de oócitos recuperados e embriões produzidos, sobretudo na raça Nelore (Viana et al., 2017; Viana, 2018; Viana et al., 2018; Gonçalves e Viana, 2019).

Diferenças fisiológicas entre zebuínos e taurinos são conhecidas, sendo que vacas *Bos indicus* apresentam maior número de folículos recrutados no ciclo estral (Carvalho et al., 2008), beneficiando a recuperação oocitária através da aspiração folicular (OPU). A influência de algumas raças e de características individuais foram estudadas para determinar a relação com a eficiência da PIVE (Pontes et al., 2011; Santos et al., 2016; Monteiro et al., 2017; Watanabe et al., 2017).

Conhecer a eficiência da raça e da doadora na recuperação de oócitos e sua relação com a produção de embriões é importante para estabelecer parâmetros em condições comerciais. Desta forma, objetivou-se analisar em estudo retrospectivo a relação entre o número de oócitos, número de embriões e taxa de embriões de sessões de OPU/PIVE de doadoras das raças Gir e Nelore.

Material e métodos

Realizou-se um estudo retrospectivo, utilizando um banco de dados de laboratório comercial composto por informações de 4.238 sessões de OPU/PIVE realizadas em doadoras *B. indicus* das raças Gir ($n = 1.115$) e Nelore ($n = 3.123$), na Região Sudeste do Brasil, entre os anos de 2008 e 2010. O sêmen utilizado pertencia à mesma raça da doadora. Foram considerados para análise somente os dados de doadoras que obtiveram número de oócitos viáveis maior ou igual a 1.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade

Católica do Paraná, registrado através do protocolo nº 01609/2019 para cessão de uso de dados com anuência da fonte. Os dados foram concedidos por única empresa, localizada no estado de São Paulo, com múltiplas equipes de OPU e utilizando procedimento padrão para a PIVE.

As variáveis analisadas foram o número de oócitos viáveis, número de embriões e taxa de embriões (número de embriões/número de oócitos viáveis). O percentual de sessões OPU que não produziram embriões na PIVE foi calculado considerando o percentual de fêmeas aspiradas com pelo menos 1 oócito viável, que no dia 7 de cultivo in vitro não apresentou desenvolvimento embrionário no estágio de blastocisto. As variáveis analisadas das raças foram divididas em quartis de ordem crescente pelo número de oócitos (Q1, Q2, Q3 e Q4).

A comparação de médias das variáveis analisadas entre as raças e entre os quartis de cada raça foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA), com teste de homogeneidade de variância de Le-

vene, seguido pelo teste de Bonferroni. O teste qui-quadrado foi utilizado para comparar o percentual de sessões OPU que não produziram embriões na PIVE entre as raças e os quartis. Em todas as análises considerou-se nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS Statistics, versão 24.0 (IBM, New York, EUA).

Resultados

A raça Nelore apresentou maior média ($p < 0,001$) para número de oócitos e número e taxa de embriões (Tabela 1), além de maior número máximo de oócitos ($n = 160$) e embriões ($n = 61$) em comparação à raça Gir ($n = 90$ e $n = 32$, respectivamente). O número observado de sessões de OPU que não produziram embriões foi maior na raça Gir ($p < 0,001$), representando 20,18% em comparação à Nelore (10,92%).

Tabela 1 - Número de sessões de aspiração folicular (OPU), número total de oócitos, número médio de oócitos/OPU, número médio de embriões e taxa de embriões no dia 7 de cultivo in vitro e percentual de sessões de aspiração folicular (OPU) que não produziram embriões (sem embrião) das raças Gir e Nelore

Raça	OPU	Número de oócitos			Número de embriões		Taxa de embriões	OPU sem embrião
	n	Total (n)	OPU*	Min/Max	OPU*	Min/Max		
Gir	1.115	17.348	15,55 ± 11,60 ^a	1/90	4,39 ± 4,53 ^a	0/32	27,39 ^a	225/20,18 ^a
Nelore	3.123	74.851	23,96 ± 19,06 ^b	1/160	7,93 ± 7,47 ^b	0/61	33,19 ^b	341/10,92 ^b
p	-	-	< 0,001	-	< 0,001	-	< 0,001	< 0,001

Nota: Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Bonferroni. A comparação de sessões de OPU sem embrião na produção in vitro de embriões foi realizada pelo teste de qui-quadrado. *Média ± desvio padrão. Min/Max = mínimo/máximo.

Houve diferença entre os quartis ($p < 0,001$) para número de oócitos e de embriões; ou seja, quanto maior o número de oócitos, maior foi a média de embriões observada nas raças Gir e Nelore (Tabela 2). O Q1 apresentou a menor taxa de embriões entre os quartis e diferiu ($p < 0,0371$) dos demais quartis na raça Gir. Na raça Nelore, Q1 diferiu ($p < 0,001$) de Q3 e Q4. Na comparação entre as raças, observou-se diferença ($p < 0,05$) em todos os quartis para número de oócitos, número de embriões e taxa de embriões. Para sessões de OPU sem embrião, observa-se redução do número e percentual de sessões que não

produzem embriões à medida que aumenta o quartil. Desta forma, quanto maior o número de oócitos, menor é o número e percentual de sessões que não produzem embriões.

Discussão

Neste estudo compararam-se as raças Nelore, de aptidão de corte, e Gir, de aptidão leiteira, ambas do grupo *B. indicus*, sendo bem adaptadas ao clima brasileiro.

Tabela 2 - Média e desvio padrão do número de oócitos, número de embriões, taxa de embriões e percentual de sessões de aspiração folicular (OPU) que não produziram embrião (sem embrião), segundo o quartil crescente do número de oócitos (Q1, Q2, Q3 e Q4) das raças Gir e Nelore

Parâmetro	Raça	Q1	Q2	Q3	Q4	p
Número de oócitos*	Gir		10,03 ± 1,55 ^{ba}	16,37 ± 2,40 ^{ca}	31,54 ± 10,60 ^{da}	< 0,001
	Nelore	6,09 ± 2,61 ^{ab}	14,69 ± 2,63 ^{bb}	25,14 ± 3,73 ^{cb}	49,92 ± 18,56 ^{db}	< 0,001
	p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-
Número de embriões*	Gir	1,09 ± 1,39 ^{aA}	2,87 ± 2,19 ^{ba}	4,65 ± 3,23 ^{ca}	8,95 ± 5,59 ^{da}	< 0,001
	Nelore	2,02 ± 1,94 ^{ab}	5,16 ± 3,02 ^{bb}	8,59 ± 4,38 ^{cb}	15,95 ± 9,13 ^{db}	< 0,001
	p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-
Taxa de embriões*	Gir	24,09 ± 29,51 ^{ba}	28,79 ± 21,62 ^{ba}	28,04 ± 18,80 ^{aA}	28,65 ± 15,71 ^{aA}	0,0371
	Nelore	30,84 ± 27,55 ^{ab}	35,27 ± 19,75 ^{ab}	34,21 ± 16,88 ^{cb}	32,46 ± 15,14 ^{cb}	< 0,001
	p	0,006	< 0,001	< 0,001	0,003	-
OPU (sem embrião)**	Gir	135/60,0 ^a	48/21,0 ^b	33/15,0 ^b	9/4,0 ^c	< 0,0001
	Nelore	237/70,0 ^a	57/17,0 ^b	29/9,0 ^c	18/5,0 ^c	< 0,0001

Nota: Q1 = quartil inferior; Q2 = quartil intermediário inferior; Q3 = quartil intermediário superior; Q4 = quartil superior. Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os quartis da raça pelo teste de Bonferroni na comparação de médias ou pelo teste de qui-quadrado em OPU (sem embrião). Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as raças no mesmo quartil pelo teste de Bonferroni. *Média ± desvio padrão. **Número/percentual.

Em condições comerciais são relatadas médias para a raça Nelore entre 23 e 27 oócitos viáveis, 7 e 8 embriões e taxa de embriões entre 26 e 35% (Pontes et al., 2011; Watanabe et al., 2017). Na raça Gir, médias de oócitos viáveis são relatadas entre 12 e 24, entre 3 e 6 número de embriões e taxa de embriões entre 26 e 42% (Pontes et al., 2010; Watanabe et al., 2017; Feres et al., 2018; Vizoná et al., 2020; Feltes et al., 2022), corroborando os dados encontrados no presente estudo.

Ambas as raças apresentaram amplitude amostral, sendo que na divisão por quartis a variação individual ficou mais evidente. Identificou-se que fêmeas com maior número de oócitos também apresentam maior número de embriões; conclusões similares já foram destacadas em outros estudos (Pontes et al., 2011; Watanabe et al., 2017; Feres et al., 2018). A variação no número de oócitos entre indivíduos de mesma raça pode ser explicada pela diferença nas concentrações de hormônio antimülleriano (Guerreiro et al., 2014), contagem de folículos antrais (Silva-Santos et al., 2014) e até mesmo pelo número de oócitos recuperados (Santos et al., 2016; Monteiro et al., 2017), fazendo com que animais com maior número de oócitos recuperados apresentem maior número de embriões

produzidos, podendo explicar as diferenças encontradas entre os quartis das raças Gir e Nelore.

Observou-se, neste estudo, que quanto maior o número de oócitos, menor o percentual de sessões OPU/PIVE que não produziram embriões. Na literatura, relatos contendo percentual de sessões OPU/PIVE são escassos, apenas sendo observados relatos da exclusão de dados de doadoras devido a não produção embrionária (Pontes et al., 2011; Feres et al., 2018).

A redução do percentual de sessões OPU/PIVE foi associada à alta correlação genética observada entre número de oócitos e embriões de 0,68 (Perez et al., 2016), com herdabilidade, para número de oócitos de 0,32 e repetibilidade entre 0,63 e 0,81 (Monteiro et al., 2017; Vizoná et al., 2020).

Alguns autores descrevem redução das taxas de embriões com diferenças ($p < 0,05$) à medida que aumenta-se o número de oócitos nos quartis na raça Gir, o que não foi identificado na raça Nelore (Watanabe et al., 2017; Feres et al., 2018). No presente estudo, na raça Gir, as taxas de embriões foram menores ($p < 0,05$) no quartil inferior (Q1) em comparação aos demais quartis (Q2, Q3 e Q4), enquanto na raça Nelore as taxas de embriões foram menores ($p < 0,05$) entre Q1 e os quartis Q3 e Q4.

Conclusão

A raça Nelore apresentou maiores médias de oócitos, embriões e taxa de embriões em comparação à raça Gir, sendo que o maior número de oócitos refletiu em um aumento do número de embriões e redução do número e percentual de sessões de OPU que não produziram embriões. O número e percentual de sessões que não produziram embriões foram menores na raça Nelore.

Referências

- Carvalho JBP, Carvalho NAT, Reis EL, Nichi M, Souza AH, Baruselli PS. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*. 2008;69(2):167-75.
- Feltes GL, Negri R, Raidan FSS, Feres LFR, Ribeiro VMP, Cobuci JA. Genetic evaluation of oocyte and embryo production in dairy Gir cattle using repeatability and random regression models. *R Bras Zootec*. 2022;51:e20220017.
- Feres LF, Siqueira LGB, Palhao MP, Santos LL, Brandão FZ, Viana JHM. Likelihood of pregnancy after the transfer of embryos derived from follicle aspiration and in vitro embryo production sessions with different relative efficiencies. *Anim Reprod Sci*. 2018;193:165-70.
- Gonçalves RLR, Viana JHM. Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo. *Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA 2019)*; 15-17 mai 2019; Gramado, RS. *R Bras Reprod Anim*. 2019;43(2):156-9.
- Guerreiro BM, Batista EOS, Vieira LM, Sá Filho MF, Rodrigues CA, Castro Netto A, et al. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos Taurus* and *Bos indicus* donors. *Domest Anim Endocrinol*. 2014;49:96-104.
- Monteiro FM, Batista EOS, Vieira LM, Bayeux BM, Accorsi M, Campanholi SP, et al. Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. *Theriogenology*. 2017;90:54-8.
- Perez BC, Peixoto MGCD, Bruneli FT, Ramos PVB, Balieiro JCC. Genetics analysis of oocyte and embryo production traits in Guzerá breed donors and their associations with age at first calving. *Genet Mol Res*. 2016;15(2):gmr.15027583.
- Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GMG, 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*. 2010; 74(8):1349-55.
- Pontes JHF, Sterza FAM, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KCP, et al. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale comercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*. 2011;75(9):1640-6.
- Santos GMG, Silva-Santos KC, Barreiros TRR, Morotti F, Sanches BV, Moraes FLZ, et al. High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. *Anim Reprod Sci*. 2016;165:17-21.
- Silva-Santos KC, Santos GMG, Koetz Jr C, Morotti F, Siloto LS, Marcantonio TN, et al. Antral follicle populations and embryo production - in vitro and in vivo - of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. *Reprod Domest Anim*. 2014;49(2):228-32.
- Viana JHM. 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more in vitro-produced than in vivo-derived embryos were transferred worldwide. *Embryo Transfer Newsletter*. 2018;36(4):8-25.
- Viana JHM, Figueiredo ACS, Gonçalves RLR, Siqueira LGB. A historical perspective of embryo-related technologies in South America. *Anim Reprod*. 2018;15(Supl 1):963-70.
- Viana JHM, Figueiredo ACS, Siqueira LGB. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. *Anais do 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)*; 17-19 ago 2017; Cabo de Santo Agostinho, PE. *Anim Reprod*. 2017;14(3):476-81.
- Vizoná RG, Perez BC, Peixoto MGCD, Viana JHM, Ventura RV, Vercesi Filho AE, et al. Genetic analysis of in-vitro embryo production traits in Dairy Gir. *Theriogenology*. 2020;148:149-61.
- Watanabe YF, Souza AH, Mingoti RD, Ferreira RM, Batista EOS, Dayan A, et al. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. *Anim Reprod*. 2017; 14(3):635-44.