

BIOTÉCNICAS APLICADAS À REPRODUÇÃO BOVINA: GENERALIDADES

(Biotechnical applied to the bovine reproduction: generalities)

Rômulo José Vieira¹

¹ Faculdade Integral Diferencial –FACID. Teresina-PI.

Autor para correspondência: rvieirasb@yahoo.com.br e/ou rvieira@ufpi.edu.br

RESUMO

A biotecnologia é uma forte ferramenta para a indústria pecuária. Várias biotecnias como a inseminação artificial, criopreservação de gametas e embriões; superovulação e transferência de embriões; sexagem espermática e embrionária, Recuperação de oócitos e a fertilização *in vitro*; clonagem por transferência nuclear de células embrionárias ou somáticas, transgenia e a biologia de células tronco, têm promovido o desenvolvimento científico e tecnológico em todo mundo, tornando o Brasil uma referência na produção *in vitro* de embriões. São apresentadas as principais biotécnicas aplicadas à reprodução bovina e elencadas algumas perspectivas para a pesquisa.

Palavras chave: Biotecnologia; Embriões, Fertilização; Clonagem.

ABSTRACT

The biotecnology is a strong toll for the cattle industry. Several biotechnical as the artificial insemination, gamete and embryos freezing, multiple ovulation and embryos transfer; gamete and embryo sexing, oocito recovery and *in vitro* fertilization; cloning for nuclear transfer of cells embryonic or somatic; transgenesis and the stem cell biology, have been promoting the scientific and technological development on all over the world, turning Brasil a reference in the production *in vitro* of embryos. The main

important biotechnical applied in bovine and some perspectives for the research are presented.

Key Wolds: Biotechnology; Embryos; Fertilization; Cloning

INTRODUÇÃO

Iniciando este artigo conceitua-se biotecnologia. Morris, Diskin e Sreenan (2001) mencionaram que a biotecnologia era uma “nova” ciência ou alta tecnologia condutora das indústrias farmacêuticas, médica e agro-alimentar e é aplicada para a produção ou modificação de produtos.

Wetherington (2010) definiu que biotecnologia é o uso ou manipulação de um organismo ou de seus componentes. Comentou que a moderna biotecnologia é primariamente associada à biologia molecular, clonagem e a engenharia genética. Concluiu que o avanço nas ciências biológicas permitiu isolar e manipular gens que facilitaram o desenvolvimento da biotecnologia industrial.

Neste artigo será empregado biotécnica como método ou processo de aplicação da biotecnologia.

O avanço da biotecnologia teve início em 1953 quando Watson e Crick apresentaram o modelo de dupla hélice do DNA. Seguiu com a descoberta de Arber, em 1960, de uma enzima, denominada de enzima restritiva, em bactérias, que seccionou o DNA de organismos em pontos precisos. Em 1973 Cohen e Boyer removeram um gen específico de uma bactéria e colocaram-no dentro de outro, usando a enzima restritiva. Assim teve início a tecnologia do DNA recombinante ou engenharia genética. No ano de 1977 genes de outros organismos foram transferidos para bactérias, um procedimento que eventualmente contribuiu para a primeira transferência do gene humano (Associação da Carolina do Norte Para a Pesquisa Biomédica, 2006).

Segundo Bertolini e Bertolini (2009) os avanços biológicos e tecnológicos proporcionaram o desenvolvimento de quatro gerações de tecnologias de reprodução assistida para humanos e animais. A 1^a Geração – inclui: Inseminação artificial, criopreservação de gametas e embriões; a 2^a Geração compreende: superovulação e transferência de embriões; na 3^a Geração encontra-se a sexagem espermática e embrionária, a recuperação de oócitos e a fertilização *in vitro*; a 4^a Geração envolve a

clonagem por transferência nuclear de células embrionárias ou somáticas, a transgenia e a biologia de células-tronco. Sob esta classificação apresenta-se a seguir algumas generalidades sobre a biotecnologia aplicada à reprodução.

Primeira geração biotecnológica

Tem início com a Inseminação Artificial (IA). Para revisão da história da inseminação artificial recomenda-se Foote (2002) que mencionou Leeuwenhoek (1678) e seu assistente Hamm como as primeiras pessoas a observarem o espermatozóide, denominado- o de “animalcules” e Spallazani (1784) foi quem realizou a primeira IA.

Segundo Cowan (2010) a IA foi um avanço tecnológico no tradicional método seletivo de reprodução e importante ferramenta para o desenvolvimento da indústria de produção animal. Entretanto apenas 7% das fêmeas bovinas, em idade reprodutiva, eram inseminadas no Brasil, e as principais limitações para o emprego dessa biotécnica são: falhas na detecção do estro, puberdade tardia e o longo período de anestro pós-parto principalmente em gado de corte (Sá Filho et al. 2008; Vieira et al. 2004)

Na atualidade encontra-se em expansão a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). Este biotécnica teve origem em função da dificuldade em se detectar o estro e consequentemente o momento ideal para realizar-se a inseminação artificial (Mapletoft, Bó e Adams, 2008).

Pursley et al. (1995) desenvolveram o método Ovsynch que consistia em duas aplicações de GnRH intercaladas por um aplicação de PGF2 alfa, sendo a inseminação realizada no momento da aplicação da segunda injeção de GnRH, ou 24 horas após.

Posteriormente Vasconcelos et al, (1999) recomendaram o início do ovsynch entre os dias cinco e 12 do ciclo estral. Em seguida, muito protocolos foram desenvolvidos, para pecuária, de leite e de carne, utilizando implantes de progesterona, aplicações de estrógenos, GnRH, PGF2 alfa, LH, eCG, dentre outros fármacos, em fêmeas cíclicas e não cíclicas (Baruselli et al., 2008; Barros, et al., 2008; Mapletoft, Bó e Adams, 2008; Martinez et al, 2002; Sá Filho et al, 2008), sem o comprometimento da fertilidade (Sá Filho et al.,2008).

A IATF vem promovendo a produção e produtividade pela melhoria genética desses rebanhos e estabelecendo estratégias eficientes para o manejo reprodutivo (Bó et al. 2008).

Criopreservação de gametas e embriões

Deve-se aos trabalhos de Polge em 1949 a evolução do processo de criopreservação de células e tecidos. Com o avanço da criopreservação espermática foi possível a difusão de reprodutores com qualidades superiores no mundo todo (Gordon, 2004; Holt, 2000).

Gordon (2004) apresentou a composição básica para a propriedade crioprotetora de um bom diluente, como o glicerol: 1) substâncias iônicas e não iônicas que mantenham a osmolaridade e a capacidade de tamponamento da solução; 2) uma fonte de proteína ou de um material de alto peso molecular para proteger do choque térmico, como a gema de ovo, o leite ou a lecitina de soja; 3) glicose ou frutose como uma fonte energética e 4) outros aditivos como enzimas, bacteriostáticos, fungicidas e antibióticos.

Para se obter sucesso com o sêmen congelado esse deve ser submetido a uma análise laboratorial rigorosa. Papa et al. (2008) apresentaram vários métodos empregados para se avaliar o sêmen, quando objetiva-se sua utilização na empresa pecuária.

Criopreservação de embriões

A criopreservação de embriões é dependente do estágio de desenvolvimento e qualidade morfológica dos mesmos. A introdução do etilenoglicol como crioprotetor viabilizou a Transferência de Embriões (TE) direta, onde a remoção do etilenoglicol ocorre no útero da receptora, não alterando os resultados que eram conseguidos com o glicerol (Zanenga e Pedroso, 1997).

Dattena et al. (2000) levantaram as perspectivas da utilização da vitrificação embrionária e TE direta. Este processo permite um melhor aproveitamento de embriões de superior qualidade (Vieira et. al, 2006, 2007).

Segunda geração biotecnológica

Na reprodução animal são envolvidas a superovulação (SO) e a TE. Quanto à superovulação o objetivo perseguido é a obtenção de hormônios mais purificados e melhores conhecimentos sobre a foliculogênese (Caccia et al. 2000; Fortune e Rivera, 1999; Macmillan, 1999).

Segundo Morris, Diskin e Sreenam (2001) diferentemente do potencial da transmissão genética do reprodutor por IA, a vaca possui cerca de 10 milhões de oócitos capazes de serem fertilizados, mas, em condições naturais, produz em média quatro a cinco produtos na vida. Assim com a utilização da (SO), associada a TE, o potencial de produção genética superior dessas fêmeas aumenta significativamente.

Na TE (Rumpf, Dode e Silva, 2002) a busca é duplicar as atuais taxas médias de duas a três gestações por colheita e aumentar a frequência dessas para seis a oito por ano. Melhores protocolos para produção de embriões foram investigados (Barros et al., 2008; Baruselli et al., 2008), entretanto para produção comercial ainda existem alguns obstáculos, como a variabilidade de resposta aos fármacos (Barros e Nogueira, 2001; Baruselli et al. 2006).

Terceira geração biotecnológica

Além das já mencionadas anteriormente Bertolini e Bertolini (2009) citaram ainda a transferência intrafalopiana de gametas e zigotos e a injeção intracitoplasmática de espermatozoide, embora estas com limitadas aplicações práticas.

O primeiro grande evento referente à sexagem de gametas segundo Morris, Diskin e Sreenam (2001) foi a descoberta que o cromossomo X tem 3-4% mais DNA que o cromossomo Y. Embora esta diferença no conteúdo de DNA seja muito pequena, ela foi suficiente para se desenvolver metodologias que permitem a separação. A sexagem espermática por citometria de fluxo é a biotécnica que permanece disponível como método realizável, com repetibilidade, promovendo a seleção espermática que resulta em produtos saudáveis e reprodutivamente funcionais (Tubman et. al, 2004).

Para utilização comercial dessa biotécnica algumas limitações precisam ser superadas, como a redução de até 12% na taxa de prenhes de vacas leiteiras em relação

ao sêmen não sexado (Schenk e Everett, 2007 *apud* Schenk 2008). Rumpf, Dode e Silva (2007) tinham mencionado 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, como o grande desafio para se obter um maior ganho genético, eficiência de produção e maior flexibilidade no manejo do rebanho, bem como a produção de fêmeas ou machos, segundo a demanda do mercado, resultando um maior ganho econômico.

Quanto a fertilização *in vitro*, Gonsalves et al (2002) relataram o marco histórico, ocorrido na década de 50, do nascimento do primeiro animal (coelho) gerado a partir dessa biotécnica. No bovino a primeira fertilização *in vitro* (Iritani e Niwa, 1977) ocorreu no Japão. Na atualidade o Brasil tem sido fundamental no processo de expansão dessa biotécnica (Meirelles et al., 2008).

A técnica de punção folicular contribuiu significativamente para a produção *in vitro* de embriões, entretanto no tocante à genética muito ainda precisa se estudar (Meirelles et al., 2008). Varago et. al, (2008) destacaram que a viabilidade econômica desta técnica está intimamente relacionada a eficiência dos laboratórios.

Quarta geração biotecnológica

Nesta geração estão incluídas a clonagem por transferência nuclear de células embrionárias ou somáticas, a transgenia e a biologia de células tronco.

A clonagem em mamíferos teve início com os trabalhos de Wilmut et al (1997) a partir da ovelha Dolly. Posteriormente muito trabalhos foram publicados e atualmente sabe-se que a eficiência da clonagem fica em torno de 7% para as fêmeas e 12% para os machos tendo em vista que há uma maior mortalidade neonatal entre as fêmeas, do que entre os machos (Bertolini e Anderson, 2002; Meirelles et al, 2008; Panarace et al, 2007).

A clonagem tem contribuído para estudos científicos básicos, preservação de raças e espécies em vias de extinção, melhoramento animal e, sem dúvida, dará suporte a produção de animais transgênicos (Rumpf, Dode e Silva, 2002).

Os estudos sobre a clonagem têm evoluído em todo o mundo, principalmente após o trabalho de Tomé et al (2004) que demonstraram não haver risco à saúde humana associado ao consumo de produtos derivados de clones bovinos.

Animais transgênicos

Bertolini e Bertolini (2009) definiram animal transgênico aquele que tem em seu genoma um material genético originado de outra espécie. Segundo Morris, Diskin e Sreenam (2001), a transgenia deu origem ao termo Biofarmácia. O potencial desta biotécnica permitiria que 10 a 100 vacas produzissem proteínas farmacêuticas suficientes para atender a demanda mundial, com um custo de produção mais satisfatório que a indústria tradicional. A clonagem, associada a animais transgênicos poderá produzir proteínas recombinantes como a lactoferrina e o fator IX, no leite desses animais. Além disto a transgenia poderá ser utilizada para produzir animais para xenotransplantes (Meirelles et al 2008)

Com relação as células troncos estas são a ferramenta que se apresenta com maior potencial para reparar transtornos degenerativos adquiridos, permitindo a produção de novas alternativas de tratamento, com maior ênfase para os humanos, contudo os estudos com animais de laboratórios e domésticos colaboram significativamente para o avanço desta biotécnica (Hashiguchi, Duchon, e Garcia, 2010)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento da pecuária nacional está associado às biotécnicas utilizadas. O Brasil é detentor de um bom nível técnico-científico das biotécnicas aplicadas à reprodução animal e tem se destacado como um dos maiores produtores de embriões in vitro, não só pelo domínio da técnica, mas pela qualidade do nosso rebanho, principalmente no tocante a gado de corte.

A partir do domínio dessas biotécnicas o passo a ser perseguido é o avanço nos marcadores moleculares de interesse zootécnico, como mapeamento de locos de características quantitativas QTL, genes candidatos (genes de ação biológica conhecida e que estão envolvidos com o desenvolvimento ou a fisiologia de uma característica de interesse econômico segundo Bryne & McMullen, 1996, *apud* Coutinho e Rosário,

2010) e sequenciamento de DNA e mRNA, incluindo expressão gênica. Os marcadores moleculares têm sido uma ferramenta poderosa para a identificação das mutações que influenciam características controladas por um ou poucos genes (Coutinho e Rosário, 2010).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO DA CAROLINA DO NORTE PARA A PESQUISA BIOMÉDICA (2006) Biotechnology. Disponível em: <http://www.aboutbioscience.org/pdfs/Biotechnology.pdf>. Acesso em 10 mar. 2012
- BARROS, C.A., NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, v.56, p. 1483-1496, 2001.
- BARROS, C.A. Atualidades na superovulação de doadoras *Bos taurus* e *Bos indicus*. Biotecnologia da reprodução em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3, 2008, Londrina-PR. p. 168-174, 2008.
- BARUSELLI, P.S. et al. The use of hormonal treatment to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science*. v. 82-83, p. 479-486, 2004.
- BARUSELLI P.S. et al. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, v.65, p.77-88, 2006.
- BARUSELLI, P.S. et al. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE, SOB em tempo fixo. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3, 2008, Londrina-PR. p.146-167, 2008.
- BERTOLINI, M.; ANDERSON, G.B. The placenta as a contributor to production a large calves. *Theriogenology*, v.57, n.1, p. 181-187, 2002.
- BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L.R. Advances in reproductive technologies in cattle from artificial insemination to cloning.. *Rev. Med. Vet. Zoot.* v.56, p. 184-94, 2009.
- BÓ, G.A. et al. Actualizacion sobre protocolos de IATF em bovinos de leche. Biotecnologia da Reprodução em Bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3, 2008, Londrina-PR. p.95-110, 2008.
- CACCIA,M. et al. Effect of pretreatment with ECG on superovulatoru response in CIDR-B treated beef cattle. *Theriogenology*, v.53, p. 495, 2000.

COUTINHO, L. L. do ROSÁRIO, M.F. *Biotecnologia animal. Estudos avançados*, v.24, n.70, p. 123-147, 2010.

COWAN, T. *Biotechnology in Animal Agriculture: Status and Current Issues*. Congressional Research Service, Analyst in Natural Resources and Rural Development. Acesso 10 mar. 2012. Disponível em: <http://www.cnie.org/NLE/CRSreports/10Oct/RL33334.pdf>.

DATTENA, M. et al. Lambing rate following transfer after vitrification of in vitro and in vivo-produced ovine embryos. *Theriogenology*, v.53, p, 252, 2000.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M. Persistent dominant follicles in cattle: Basic and applied aspects. *Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre*, v.7, n.24-36, 1999, (Suple.).

FOOTE., R. H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. Acesso em: 09 fev.2012. Disponível em: <http://www.asas.org/Bios/Footehist.pdf>.

GONSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.de F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal: São Paulo- SP. Varela*. 2002. 340p.

GORDON I. *Reproductive thecnologies in farm animals*. Wallingford, UK: CAB International, 2004. 332p.

HASHIGUCHI, B. T.; DUCHEN, H.A.C.; GARCIA, R.M. Células tronco embrionárias em bovinos e felinos uma revisão. Acesso 10 mar. 2012. Disponível em: <http://www.fait.edu.br/revistas/agrarias/2semestre10/01.pdf>

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v.43, p.47-58, 2000.

IRITANI, A. NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. of Reprod. Fertility*. v.50, p.119-121, 1977.

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.

MAPLETOFT, R.J.; BÓ, G.A.; ADAMS, GP. Techniques' for synchronization of follicular wave emergence and ovulation: Past, present and future. *Biotechnology da Reprodução em Bovinos*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3, 2008, Londrina-PR. p.15-25, 2008.

- MARTINEZ, M.F. et al. The use a progesterone-releasing device (CIDR) or megestrol acetate with GnRH or estradiol benzoate for fixed-time AI in beef heifers. *J. Anim. Sci.* V.80, p. 1746-1751, 2002.
- MEIRELLES, F.V. et al. Perspectivas para as técnicas de FIV, clonagem e transgenia. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3, 2008, Londrina-PR. p.195-205, 2008
- MEIRELLES, F.V. et al. Transferência de núcleo: potenciais aplicações no controle genético nuclear e citoplasmático. *Ver. Bras. Reprod. Anim.* v. 31, p. 383-390, 2007.
- MEIRELLES, F.V. et al. Desafios para clonagem comercial- planejando o futuro. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 34, p.235-242, 2006, Supl.1
- MORRIS, DG; DISKIN, M.G.; SREENAM, J.M. Biotechnology in cattle reproduction. *Beef Production*, series nº 39, 2001.
- PANARACE, M.. et al. How healthy are clones and their progeny: 5 years of Field experience. *Theriogenology*. v. 67, p. 142-151, 2007.
- PAPA, F.O. et al. Impacto do sêmen no sucesso dos programas de IATF: métodos básicos e avançados de avaliação. *Biotecnologia da reprodução em bovino*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3, 2008, Londrina-PR. p. 78-94, 2008.
- PURSLEY JR, MEE MO, WILTBANK MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂α and GnRH. *Theriogenology*. v.44, p. 915-23, 1995.
- RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção in vitro de embriões. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, Suplemento especial, p. 229-233, 2007.
- RUMPF, R.; DODE, M.A.N.; SILVA, A.E.D. Avanços na biotecnologia da reprodução dos bovinos. In: Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 3,2002, Juiz de Fora, MG, p. 248-253, 2002.
- SÁ FILHO, M.F. et al. IATF em novilhas. *Biotecnologia da Reprodução em Bovinos*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3, 2008, Londrina-PR. p.54-67, 2008
- SCHENK, J.L. Sexing bovine sperm. *Biotecnologia da reprodução em bovinos*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 3, 2008, Londrina-PR. p.127-132, 2008.

- TOMÉ, D.; DUBARRY, M.; FROMENTIN, G.; Nutritional value of milk and meat products derived from cloning. *Cloning Stem Cell*. v.6, p. 172-177, 2004.
- TUBMAN, L.M. et al. Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sortin. *J. Anim. Sci.* v.82, p.1029-1036, 2004.
- VARAGO, FB; MENDONÇAS, LF; LAGARES, M de A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Rev. Bras. de Reprod. Anim. Belo Horizonte*, v.32, n.2, p. 100-109, 2008.
- VASCONCELOS, J.L.M.; et al. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.52, p.1067-1078, 1999.
- VIEIRA, A.D, et al. Bovine in vitro embryo production protocol: does it really influence embryo cryotolerance? *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, p 57-63, 2006.
- VIEIRA, A.D.; et al. In -straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts in jand-pulled glass micropipettes. *Anim. Reprod. Sci.* v. 99, p.377-383, 2007.
- VIEIRA, R.J.; et al. Sincronização do ciclo estral em vacas mestiças pela administração do fator liberador de Gonadotrofina (GnRH) em associação com prostaglandina F2 alfa (PGF₂α). *Rev. Bras. de Reprod. Anim.* v.28, p.215-220, 2004.
- WETHERINGTON, J. Introduction to Biotechnology: A Georgia Teachers Resource Manual. 2010, 87p.
- WILMUT, I. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. v. 385, p. 810-813, 1997.
- ZANENGA, C.A.; PEDROSO, M.F.; Comparison between the pregnancy rates of frozen bovine embryos with glycerol or ethylene glycol. *Arq. Fac. Vet. UFRPG, Porto Alegre*. v.25, n.1, p. 145-146, 1997 (Supl.).