

LZT 0648 - Manejo da Reprodução e da Inseminação Artificial

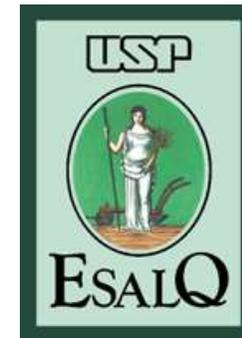
Departamento de Zootecnia – ESALQ/USP

Uso de biotecnologias da reprodução

M. Sc. Carlos Eduardo Cardoso Consentini¹,

Roberto Sartori¹ e colaboradores

¹ Laboratório de Reprodução Animal, Departamento de Zootecnia - ESALQ/USP



Cronograma da apresentação

- ✓ **IATF**
- ✓ **Produção *in vivo* e *in vitro* de embriões**
- ✓ **Uso de sêmen sexado na IA e na produção de embriões**
- ✓ **Uso de US doppler para diagnóstico precoce de gestação**

**Produção *in vivo* (SOV) e *in vitro* de embriões
e transferência em tempo fixo
(TETF)**



**Otimização do uso da fêmea
como material genético**

Cenário mundial da produção de embriões bovinos

Região	Embriões <i>in vivo</i>				Embriões <i>in vitro</i>				Total
	Leite	Corte	Subtotal	%	Leite	Corte	Subtotal	%	
África	402	5.132	5.534	59,7	0	3.733	3.733	40,3	9.267
Ásia	16.057	89.628	105.685	91,8	1.162	8.276	9.438	8,2	115.123
Europa	104.174	23.806	127.980	90,3	12,840	940	13,780	9,7	141,760
Oceania	2.178	9.009	11.187	74,2	3,892	0	3,892	25,8	15,079
A. do Norte	127.613	232.407	360.020	62,9	105,198	106,848	212,046	37,1	572,066
A. do Sul	8.636	41.179	49.815	11,9	208,752	161,068	369,820	88,1	419,635
Total	259.060	401.161	660.221	51,9	331,844	280,865	612,709	48,1	1,272,930

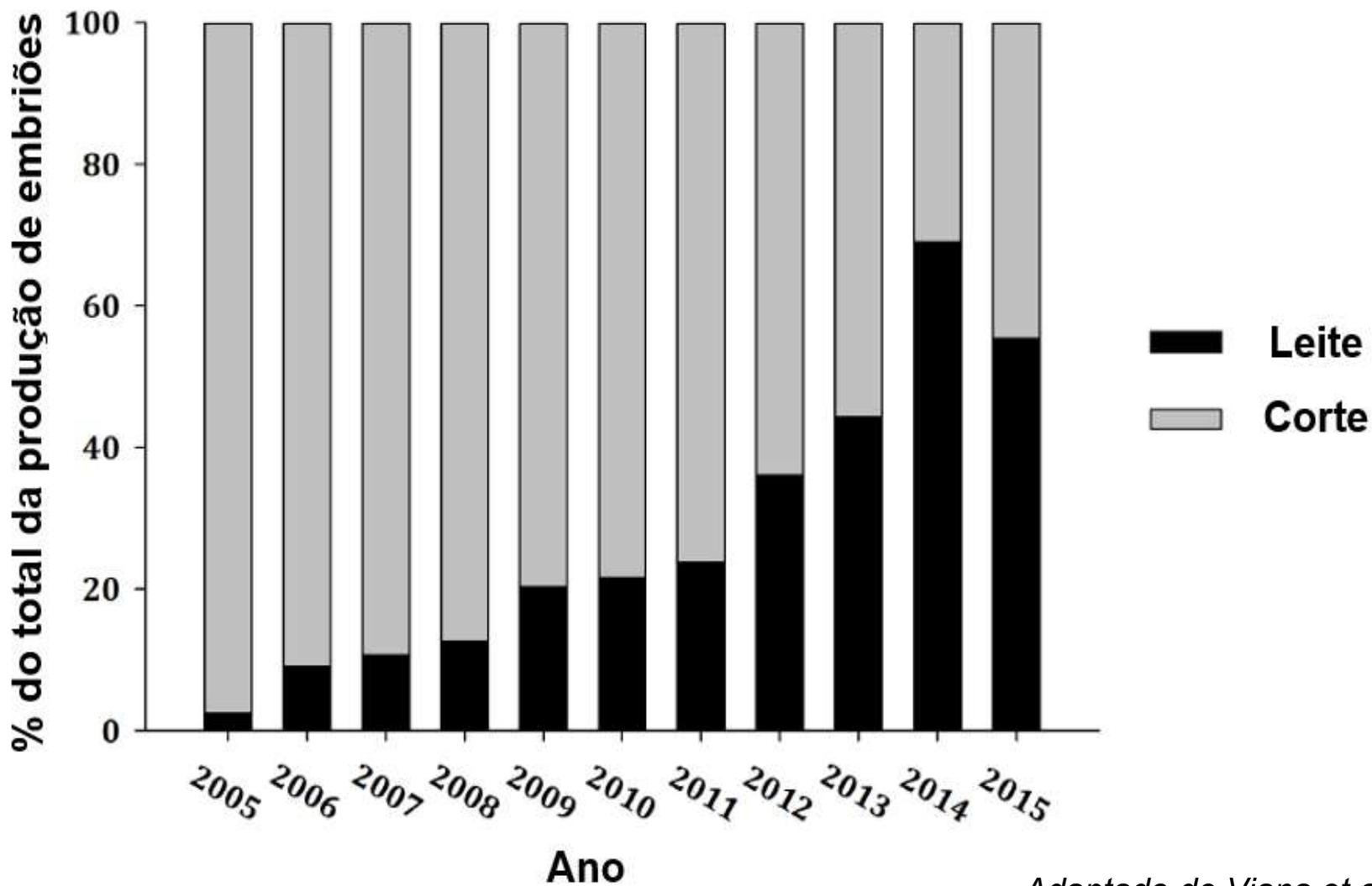
Adaptado de Perry (2016)

Cenário mundial da produção de embriões bovinos

Ano	Embriões <i>in vivo</i>			Embriões <i>in vitro</i>			Total		
	Brasil	Mundo	%	Brasil	Mundo	%	Brasil	Mundo	%
2015	22.355	660.221	3,4	353.539	612.709	57,7	375.894	1.272.930	29,5
2014	43.337	614.464	7,1	348.468	590.359	59,0	391.805	1.204.823	32,5
2013	50.455	729.246	6,9	366.517	546.628	67,1	416.972	1.275.874	32,7
2012	52.719	699.585	7,5	334.913	443.533	75,5	387.632	1.143.118	33,9
2011	32.646	732.862	4,5	318.116	453.471	70,2	350.762	1.186.333	29,6
2010	38.974	732.227	5,3	264.263	450.549	58,7	303.237	1.182.776	25,6
2009	42.397	704.230	6,0	255.993	378.244	67,7	298.390	1.082.474	27,6
2008	69.527	746.250	9,3	220.425	330.953	66,6	289.952	1.077.203	26,9
2007	57.368	763.467	7,5	212.441	434.581	48,9	269.809	1.198.048	22,5
2006	83.741	777.747	10,8	204.402	441.364	46,3	288.143	1.219.111	23,6
2005	122.210	789.972	15,5	137.042	330.647	41,4	259.252	1.120.619	23,1

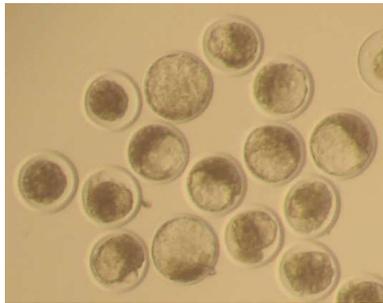
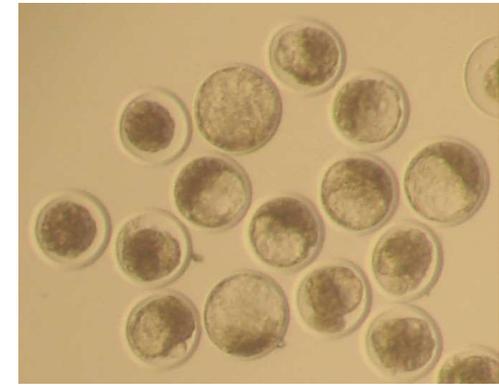
Adaptado de Viana et al. (2017)

Produção de embriões no Brasil de acordo com raça (corte ou leite)



Adaptado de Viana et al. (2017)

Produção *in vivo* e *in vitro* de embriões e TETF



Produção *in vivo* e *in vitro* de embriões e TETF

✓ Vantagens da produção *in vivo* e *in vitro* de embriões

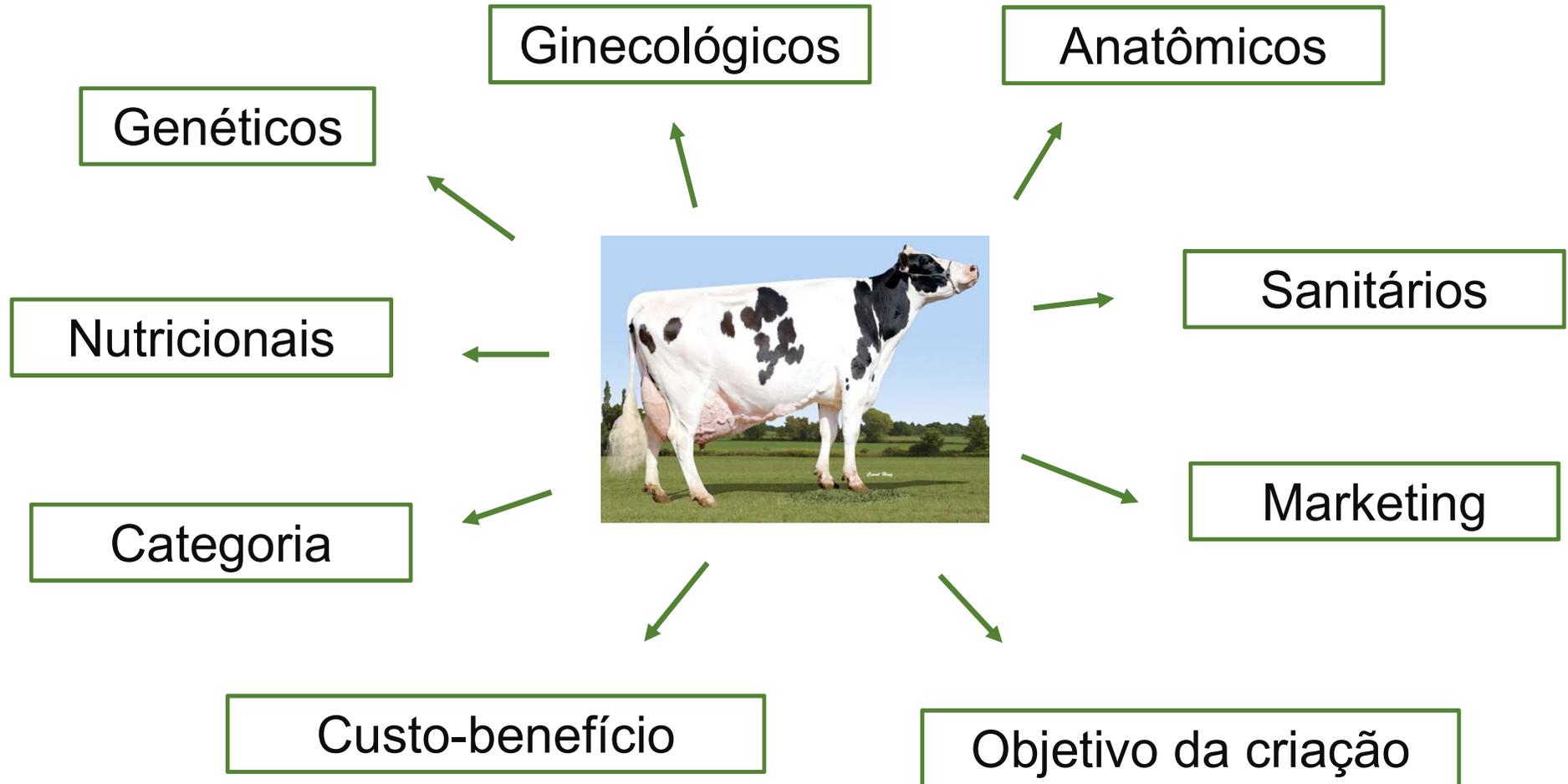
- Maximização do material genético da matriz
- Maximização do número de descendentes de uma matriz
- Exploração de animais senis ou que não podem ficar gestantes
- Geração selecionada a partir do macho e da fêmea
- Armazenamento de material genético da fêmea
- Estratégias de mercado
- Pesquisa

Produção *in vivo* e *in vitro* de embriões e TETF

- ✓ Limitações e exigências produção *in vivo* e *in vitro* de embriões
 - Profissional para a implementação da técnica
 - Decisão de estratégias, calendário e manejos
 - Mão de obra qualificada – ainda mais que a IATF
 - Custos (hormônios, laboratório e serviços)
 - Índices ainda tem de ser maximizados
 - Necessidade de receptoras (barrigas de aluguel)

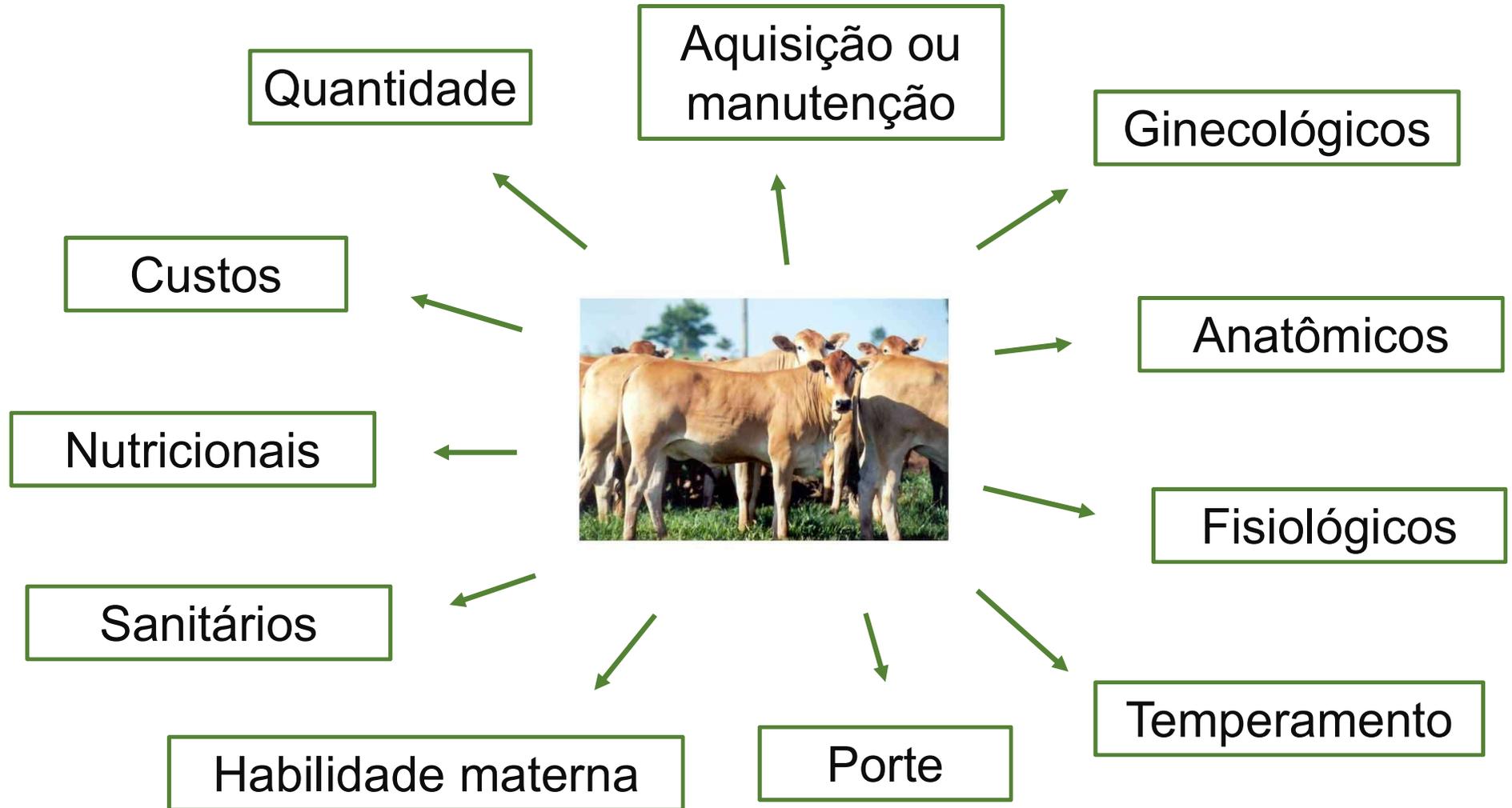
Produção *in vivo* e *in vitro* de embriões e TETF

✓ Seleção de doadoras



Produção *in vivo* e *in vitro* de embriões e TETF

✓ Seleção de receptoras



Produção *in vivo* de embriões e TETF

Base fisiológica dos protocolos de SOV para produção *in vivo* de embriões

Sincronizar a emergência da onda folicular

Permitir o crescimento de vários folículos dominantes

Regressão do corpo lúteo

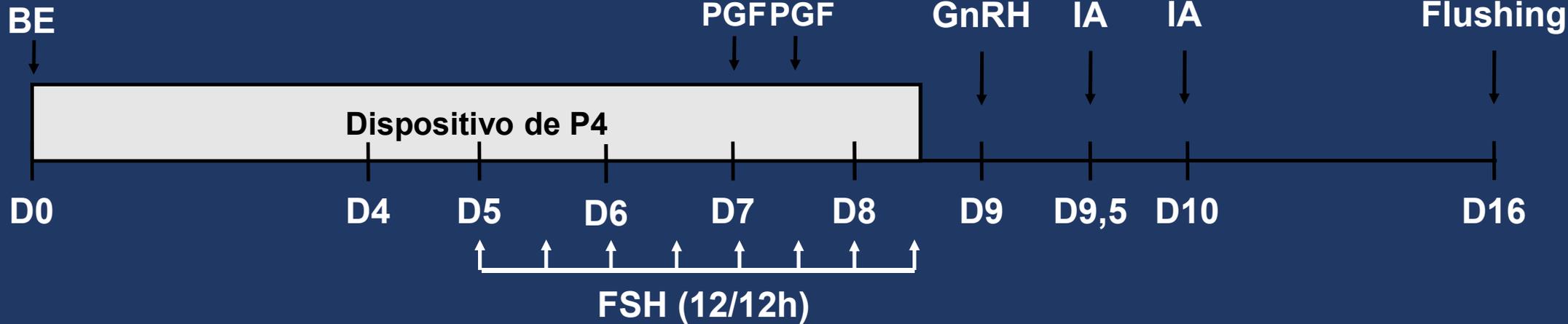
Indução da ovulação sincronizada dos folículos

IATF das doadoras

Coleta dos embriões ~7 dias depois

Congelamento ou transferência dos embriões para as receptoras

Base fisiológica dos protocolos de SOV

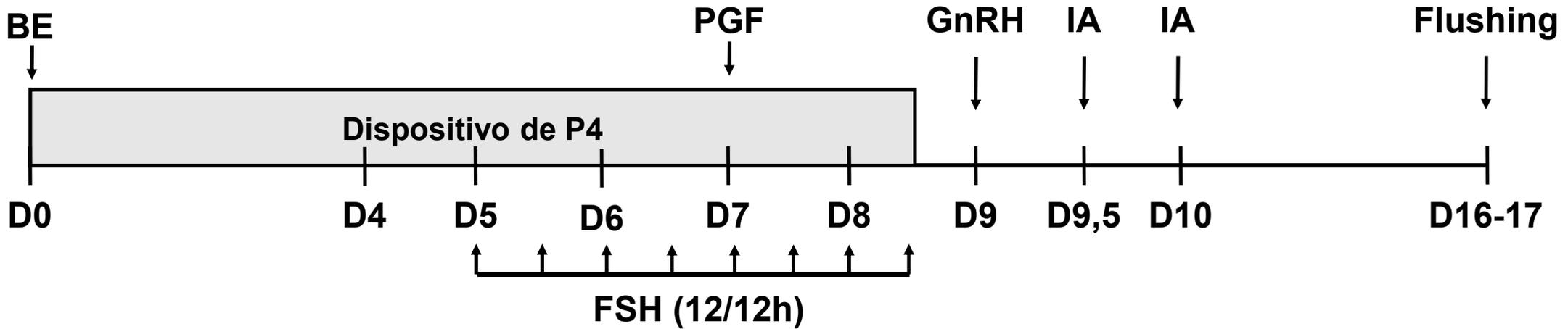


Ovários e embriões de vacas submetidas à SOV

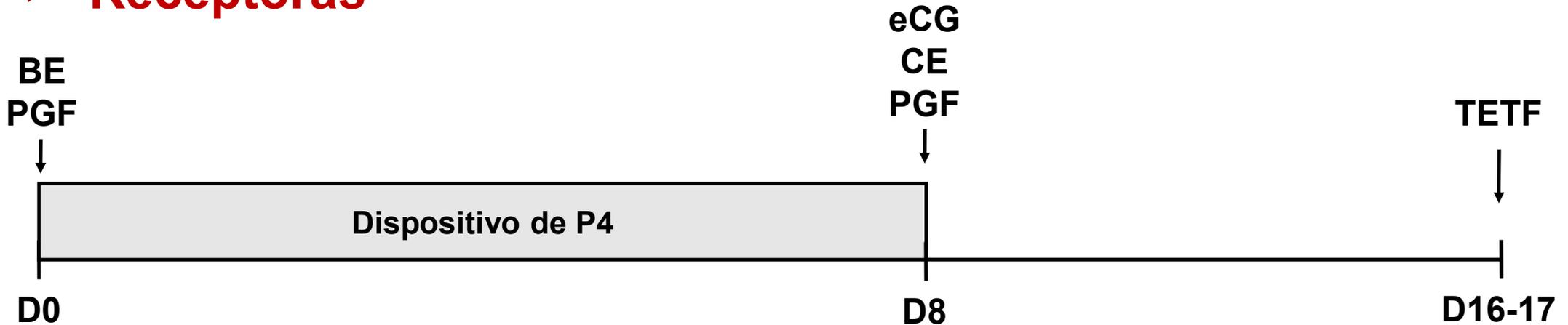


Sincronização de receptoras para TETF *in vivo*

✓ Doadoras



✓ Receptoras



Materiais e procedimentos para coleta de embriões



Vacas no d ~7

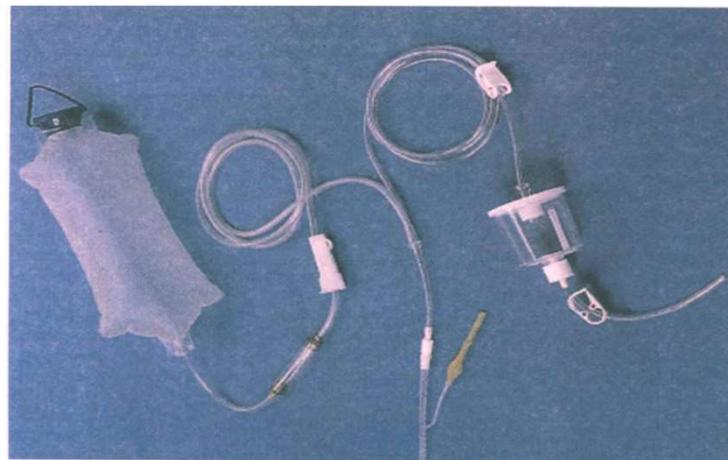
Higienização da vulva e períneo

Materiais e procedimentos para coleta de embriões

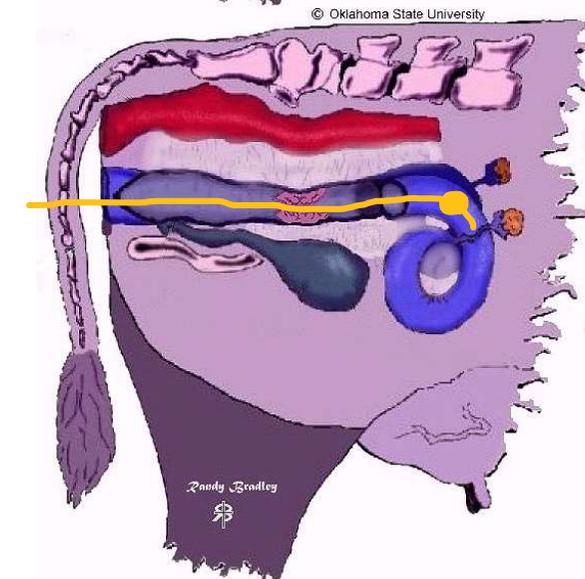
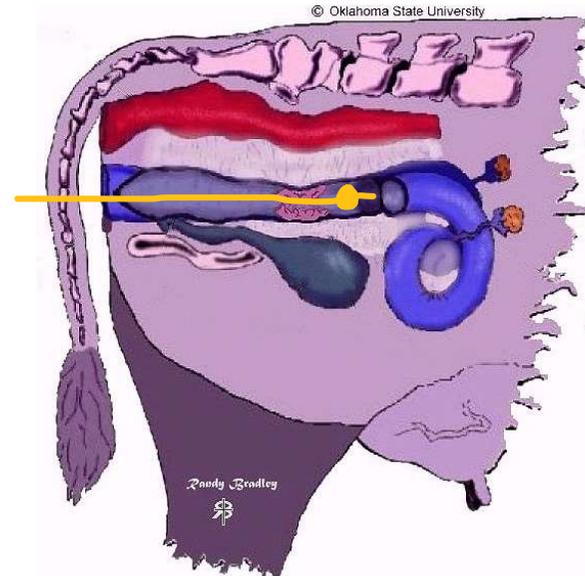
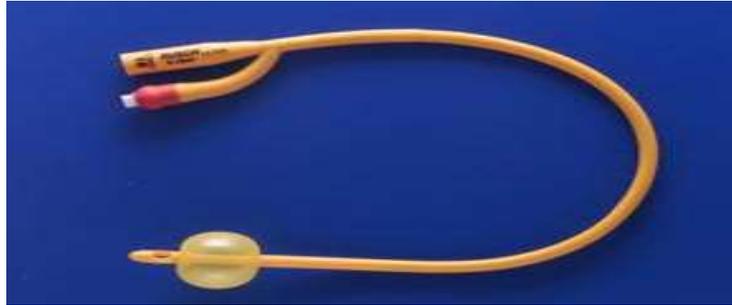


Anestesia epidural (Lidocaína 2%)

Materiais e procedimentos para coleta de embriões



Materiais e procedimentos para coleta de embriões



Materiais e procedimentos para coleta de embriões



Posicionamento (corpo/corno) da sonda e inflagem do balão

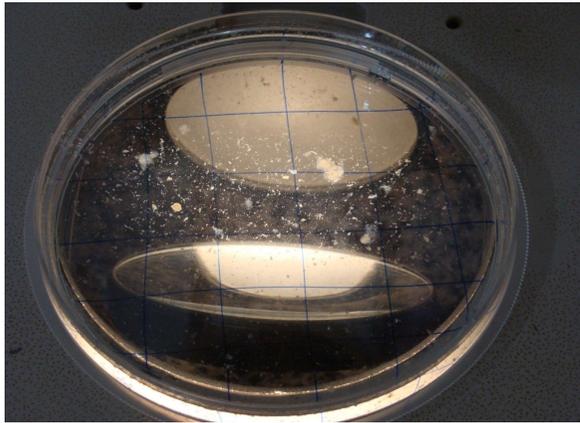


Sistema acoplado e lavagem do útero



Líquido liberado no útero voltando para o filtro

Materiais e procedimentos para manipulação de embriões no lab



Placa de petri



Placa aquecedora, meios, PBS



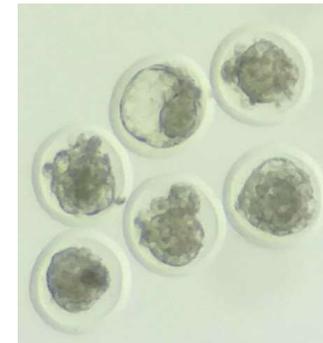
Mesa de manipulação (lupa)

Materiais e procedimentos para manipulação de embriões no lab



Passagem do conteúdo do filtro utilizado na lavagem uterina para placa de petri no laboratório

Materiais e procedimentos para manipulação de embriões no lab



Rastreamento e classificação (estágio e qualidade) dos embriões

Materiais e procedimentos para manipulação de embriões no lab



Realização dos banhos em Holding e envase para transferência a fresco ou congelação (etileno)

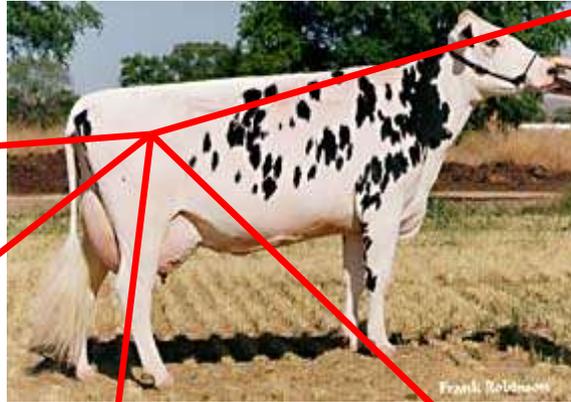
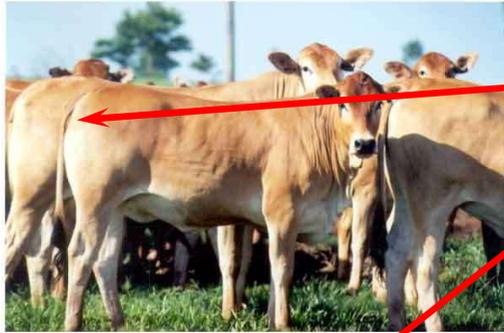


16 x Dearing, BL1, SexF, 05/20	▶ Meio	Ar		Ar	Meio	
--------------------------------	--------	----	---	----	------	---



TETF

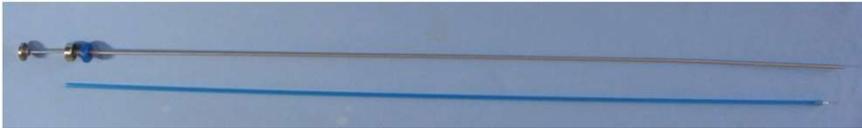
✓ Transferir a fresco em receptoras pré-sincronizadas



TETF

✓ Inovulação/transferência dos embriões

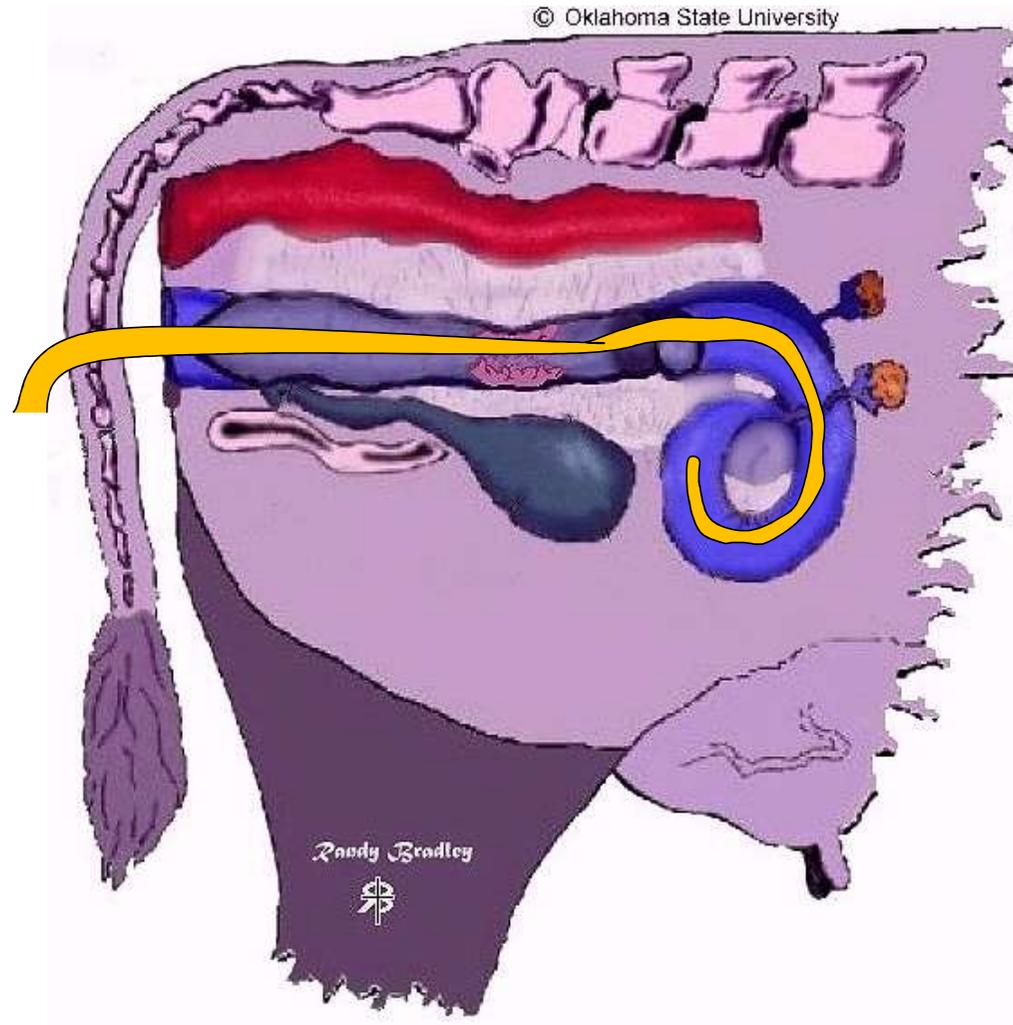
- Corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo



Anestesia epidural (Lidocaína 2%)

TETF

- ✓ Inovulação/transferência dos embriões



Produção de embriões *in vivo*

Estudo	Raça	N	Protocolos do estudo	IA	N de recuperados	N de viáveis
Oliveira et al. (2014)	Nelore	25 vacas (crossover)	133 mg de FSH BID / 4d ou substituição das duas últimas doses por eCG ou LH	2 IA (12 h de int.)	8,1	3,9
Mattos et al. (2011)	Sindhi	19 lactantes e secas (crossover)	100 mg de FSH BID / 4d ou substituição das duas últimas doses por 300 UI de eCG	2 IA (12 h de int.)	7,1	4,2
Baruselli et al. (2008)	Nelore	12 doadoras (crossover)	100 mg de FSH BID / 4d vs. 2000 vs. 2500 UI de eCG	1 IA	6,4	5,1
Baruselli et al. (2008)	Nelore	Crossover	133 mg de FSH BID / 4d vs. 1500 vs. 2000 UI de eCG	1 IA	7,0	5,7
Baruselli et al. (2008)	Holandesa	12 doadoras (crossover)	200 mg de FSH BID / 4d vs. 2000 vs. 2500 UI de eCG	1 IA	9,2	7,6
Carvalho et al. (2014)	Holandesa	56 novilhas (s/ crossover)	300 mg de FSH BID / 4d vs. FSH recombinante	2 IA (12 h de int.)	9,0	6,1
Tríbulo et al. (2011)	Angus	29 vacas (c/ e s/ crossover)	400 mg de FSH BID / 4d vs. 400 mg de FSH diluído em ácido hialurônico	2 IA (12 h de int.)	13,0	5,7
Tríbulo et al. (2012)	Cruzadas e Simental	12 Cruzadas e 14 Simmental	400 mg de FSH BID / 4d em doses constantes vs. 400 mg de FSH diluído em MAP-5	2 IA (12 h de int.)	7,6	3,1
Tríbulo et al. (2012)	Cruzadas e Simental	12 Simmental e 14 Angus secas	300 mg de FSH BID / 4d em doses constantes vs. 300 mg de FSH diluído em MAP-5	2 IA (12 h de int.)	13,0	5,0

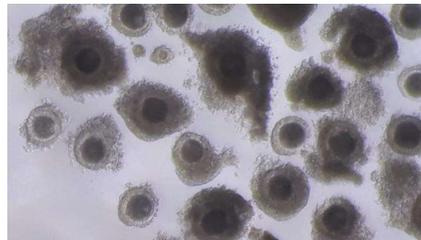
Estudos variam quanto à estratégia para induzir emergência de onda, número de tratamentos com PGF, duração de permanência do dispositivo de P4, horário e indutor de ovulação, horário da inseminação

**Produção *in vitro* de embriões
e transferência em tempo fixo
(TETF)**



**Otimização do uso da fêmea
como material genético**

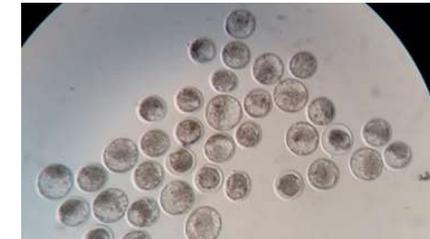
Produção *in vitro* de embriões



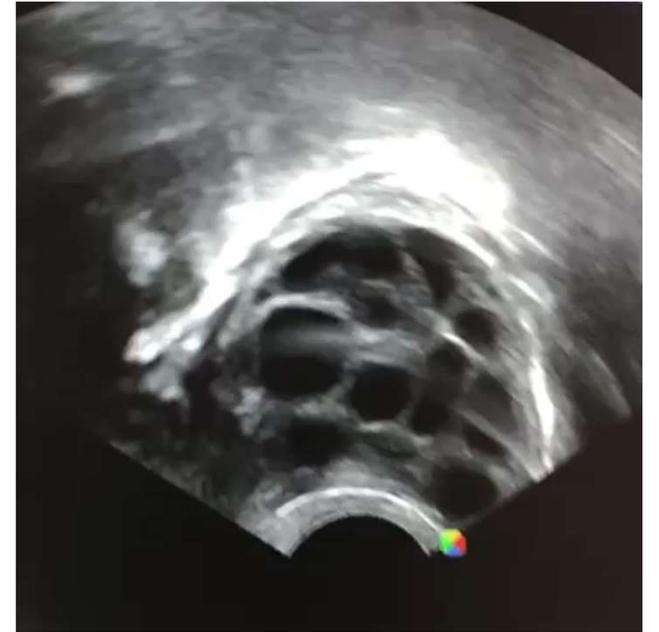
+

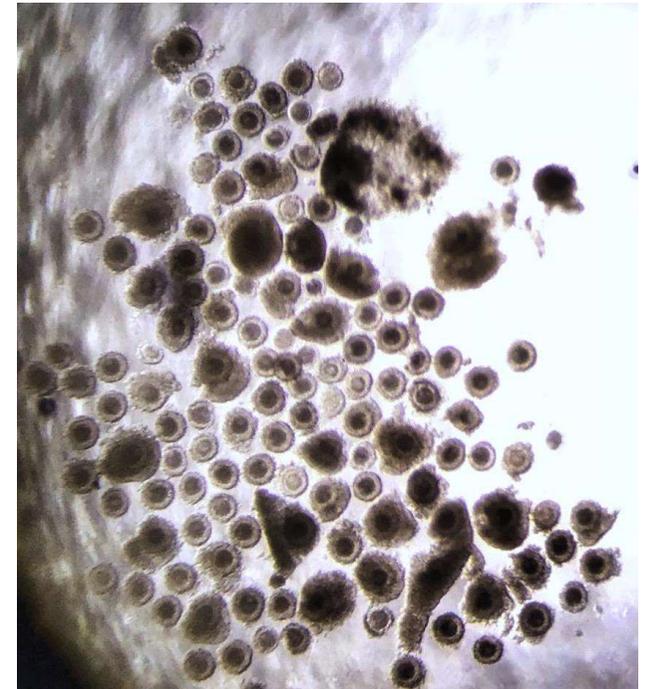
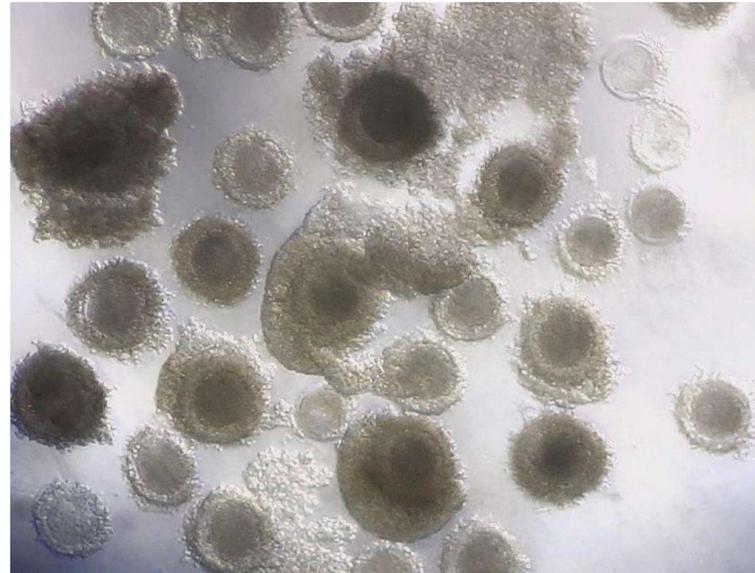
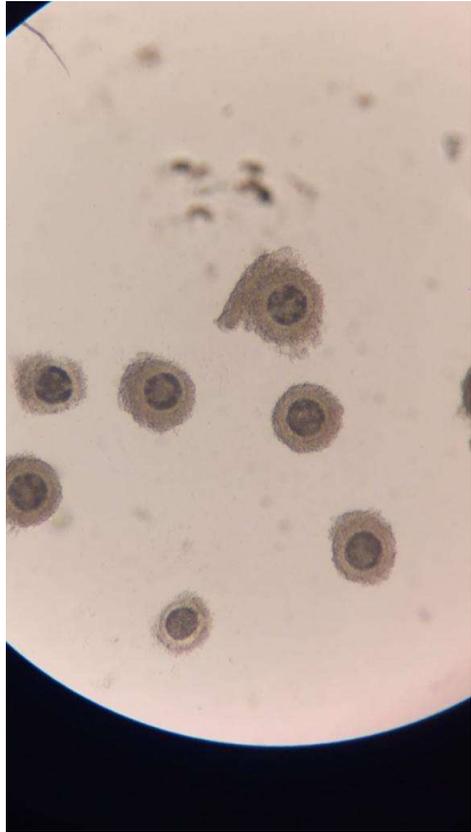


=



MIV (D-1)	FIV (D0)	CIV (D1)	Feeding (1 e 2)	D7
22-24 horas	18 horas	7 dias	D3: Feeding 1 + Tx de clivagem D5: Feeding 2	Tx de blastocisto





Produção *in vitro* de embriões de acordo com oócitos recuperados na OPU em doadoras Nelore

Item	Quartil 1	Quartil 2	Quartil 3	Quartil 4	P
N	1.403	1.403	1.403	1.403	
Oócitos/OPU	9,4 ^d (13.246/1.403)	18,1 ^c (25.376/1.403)	28,6 ^b (40.119/1.403)	53,9 ^a (75.645/1.403)	<0,001
Tx de clivagem	68,8 (8.089/11.756)	66,7 (14.900/22.337)	66,2 (23.582/35.634)	63,9 (42.714/66.860)	0,08
Tx de blastocisto	28,6 (3.364/11.756)	30,6 (6.841/22.337)	30,7 (10.948/35.634)	28,4 (19.001/66.860)	0,23
Blastocisto/OPU	2,6 ^d (3.604/1.403)	4,9 ^c (6.841/1.403)	7,8 ^b (10.948/1.403)	13,5 ^a (19.001/1.403)	<0,001

Watanabe et al. (2017)

Média = 7,2 blastocistos / OPU (40.394/5.612)

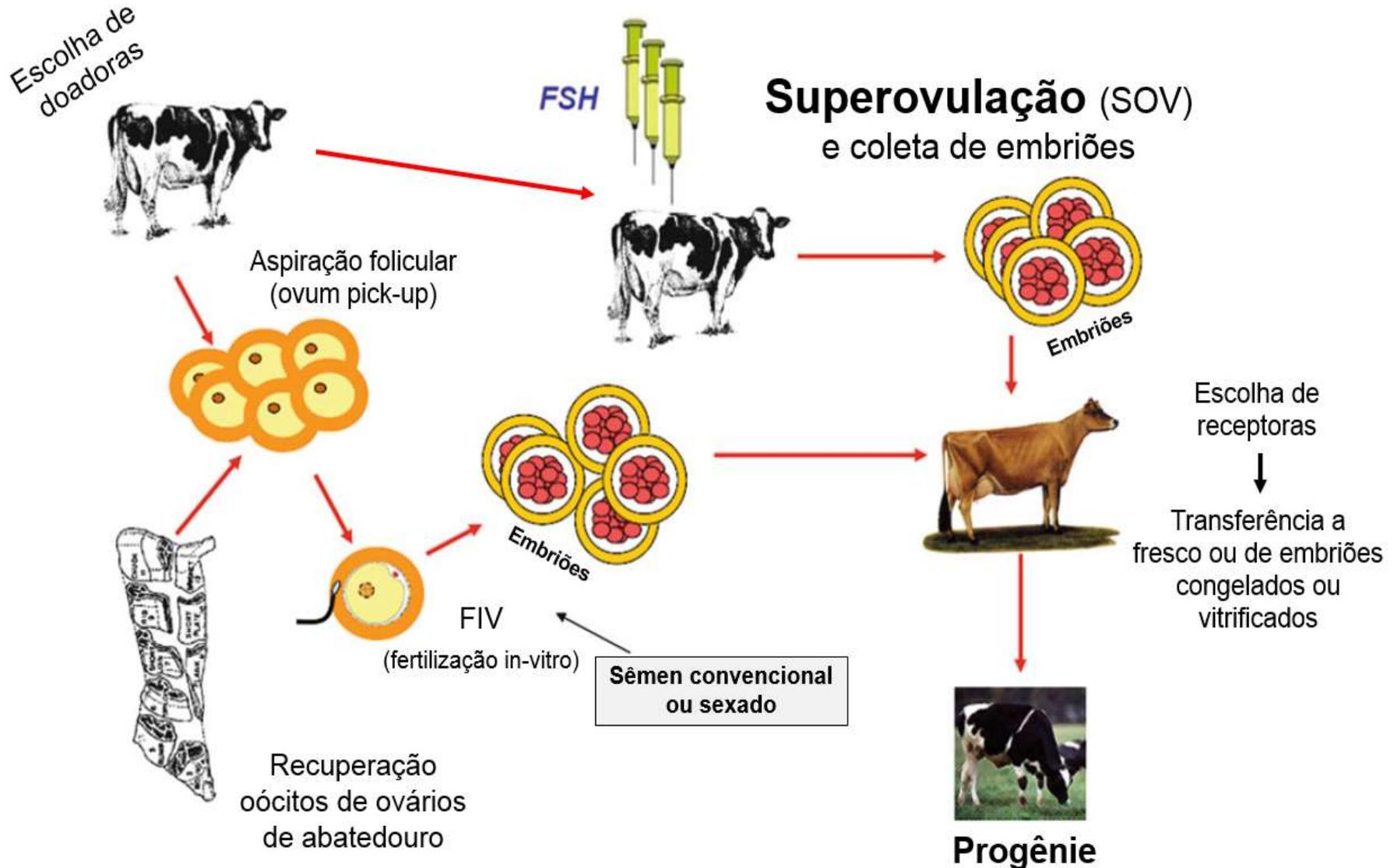
Produção *in vitro* de embriões de acordo com oócitos recuperados na OPU em doadoras Holandesas

Item	Quartil 1	Quartil 2	Quartil 3	Quartil 4	P
N	168	168	168	168	
Oócitos/OPU	6,7 ^d (1.120/168)	12,5 ^c (2.098/168)	19,4 ^b (3.256/168)	38,7 ^a (6.533/168)	<0,0001
Tx de clivagem	50,9 ^b (570/1.120)	53,9 ^{ab} (1.130/2.098)	57,8 ^a (1.883/3.256)	52,7 ^{ab} (3.441/6.533)	<0,0001
Tx de blastocisto	26,1 ^a (292/1.120)	26,2 ^a (550/2.098)	24,8 ^b (806/3.256)	20,3 ^c (1.324/6.533)	<0,0001
Blastocisto/OPU	1,7 ^d (292/168)	3,3 ^c (550/168)	4,8 ^b (806/168)	7,8 ^a (1.324/168)	<0,0001

Watanabe et al. (2017)

Média = 4,4 blastocistos / OPU (2.792/672)

Produção *in vitro* de embriões



Uso estratégico da TETF



Estações quentes do ano

Vacas repetidoras de cio

**Embrião
terapêutico**



Impacto da temperatura retal, índice de temperatura e umidade e estação do ano na prenhez por IA durante um ano reprodutivo de uma fazenda comercial de leite

**Consentini C. E. C.¹; Mingoti, R. D.²; Germano, R.²;
Souza, A. H.³; Baruselli, P. S.²; Sartori, R.¹**

¹Departamento de Zootecnia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP, Piracicaba, SP

²Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, FMVZ/USP

³CEVA – Santé Animale

2018

Impacto do estresse térmico durante um ano reprodutivo de uma fazenda comercial brasileira

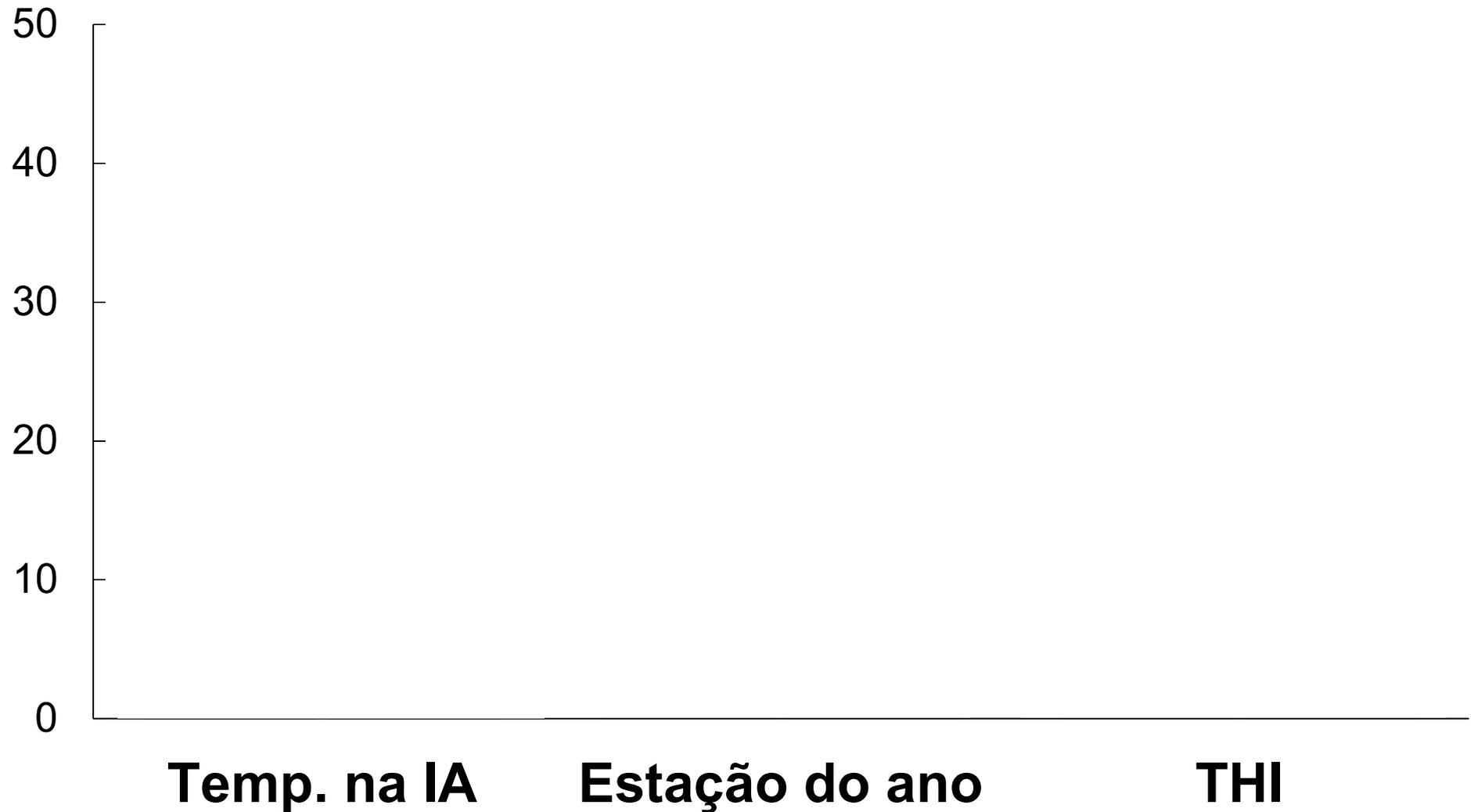
- 1.508 inseminações
- Fazenda em Carmo do Rio Claro – MG (2014)



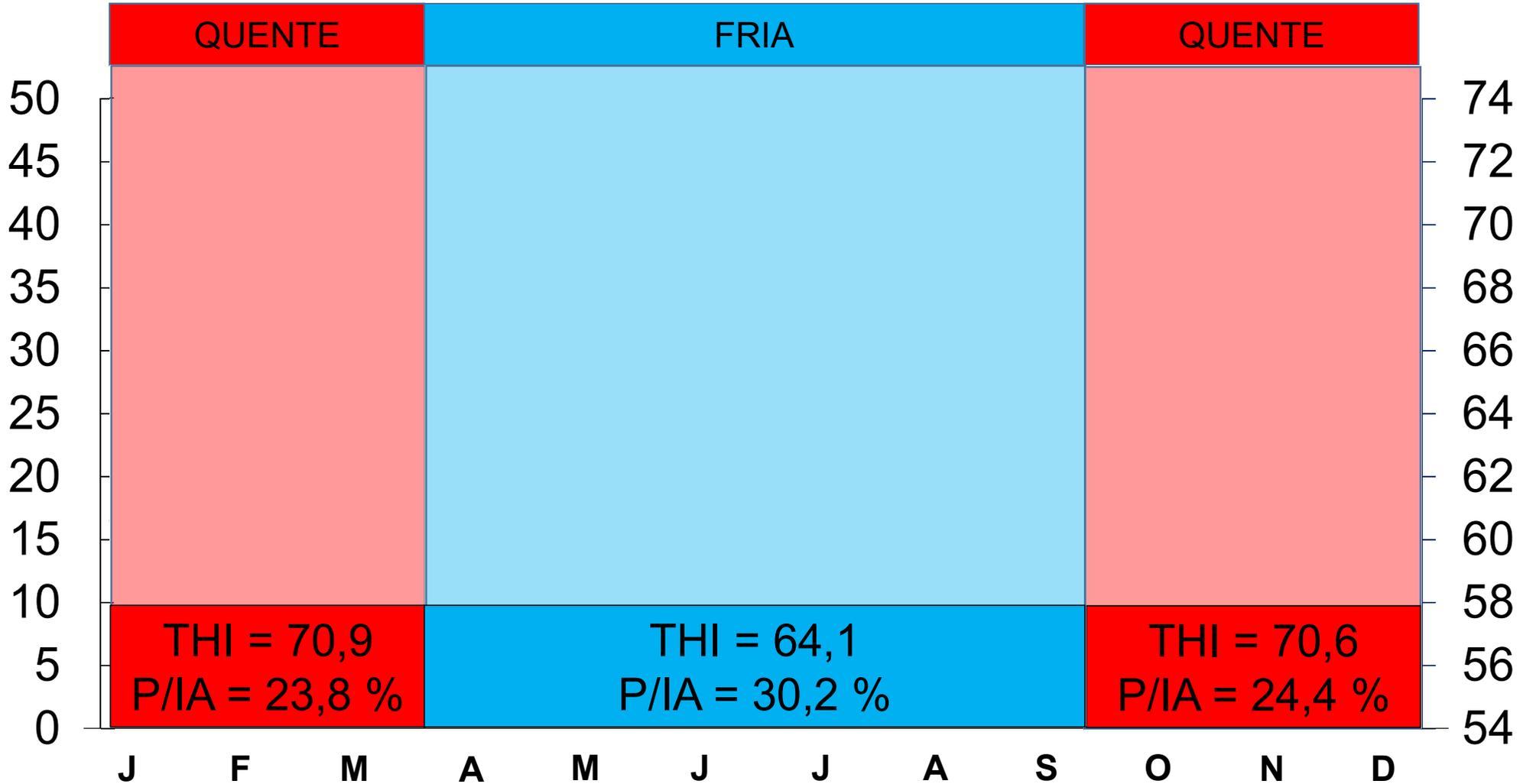
Efeitos de temp. retal no momento da IA; THI, período do dia da IA e estações do ano na fertilidade

P/IA de acordo com temp. na IA, estação do ano e THI

Consentini et al. 2018



P/IA e THI durante o ano de 2014



**Alguns mecanismos / aspectos que podem
explicar como o estresse térmico impactam
a fertilidade???**

Qualidade embrionária de vacas em lactação e novilhas/vacas secas no **VERÃO** e **INVERNO**



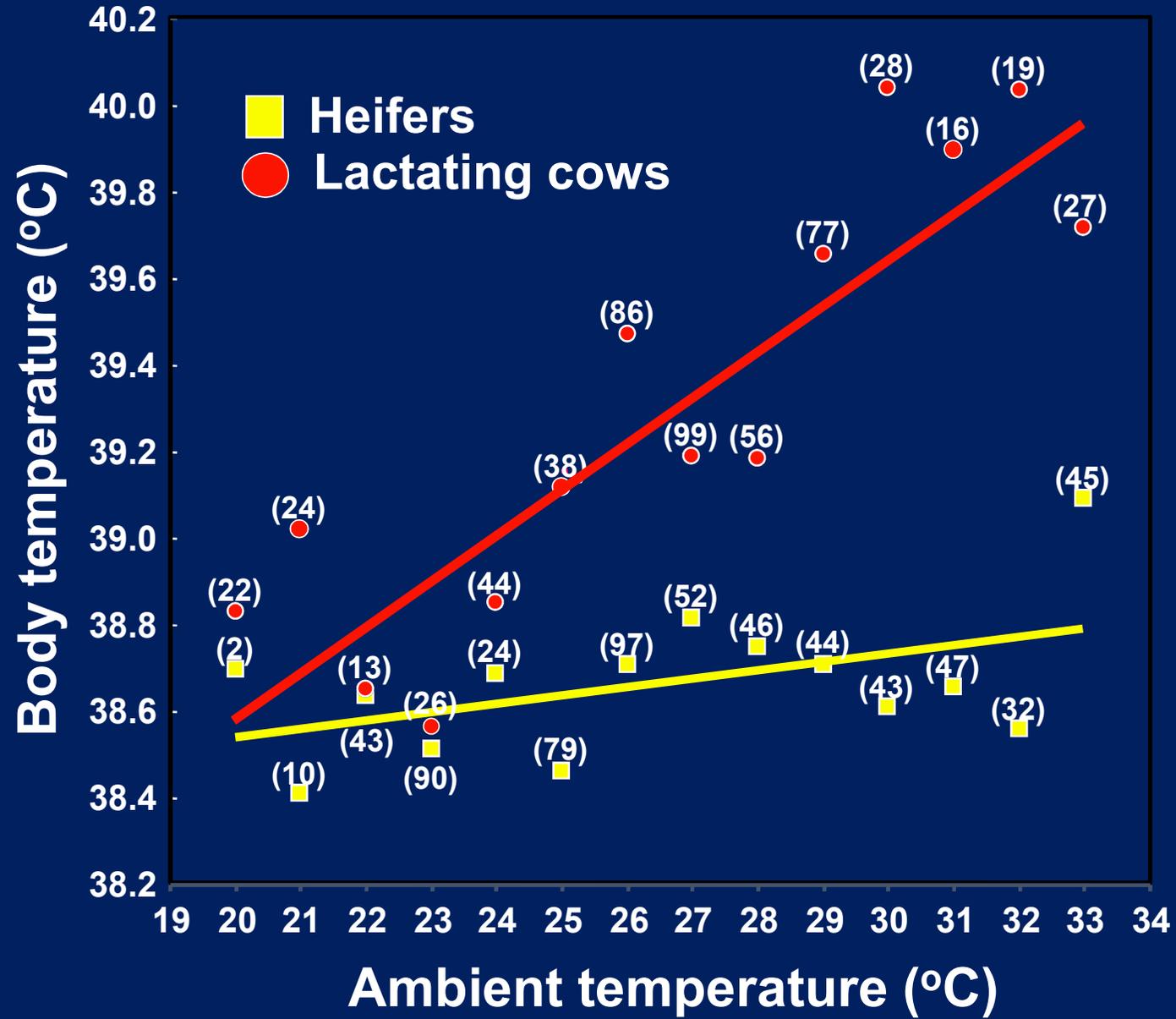
Vacas em lactação

↑ **Alta IMS**
↓ **Controle da temperatura corporal**

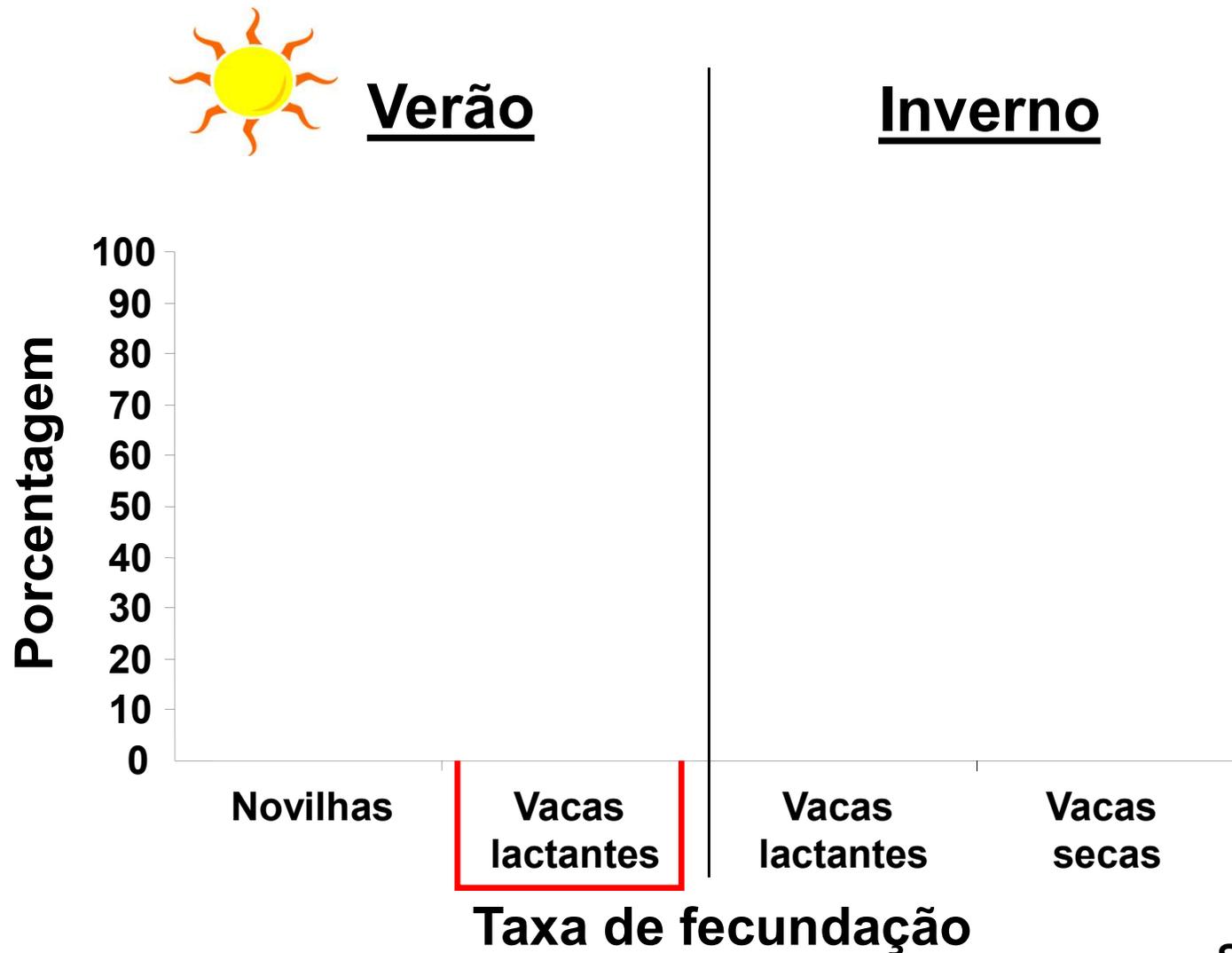


Novilhas/vacas secas

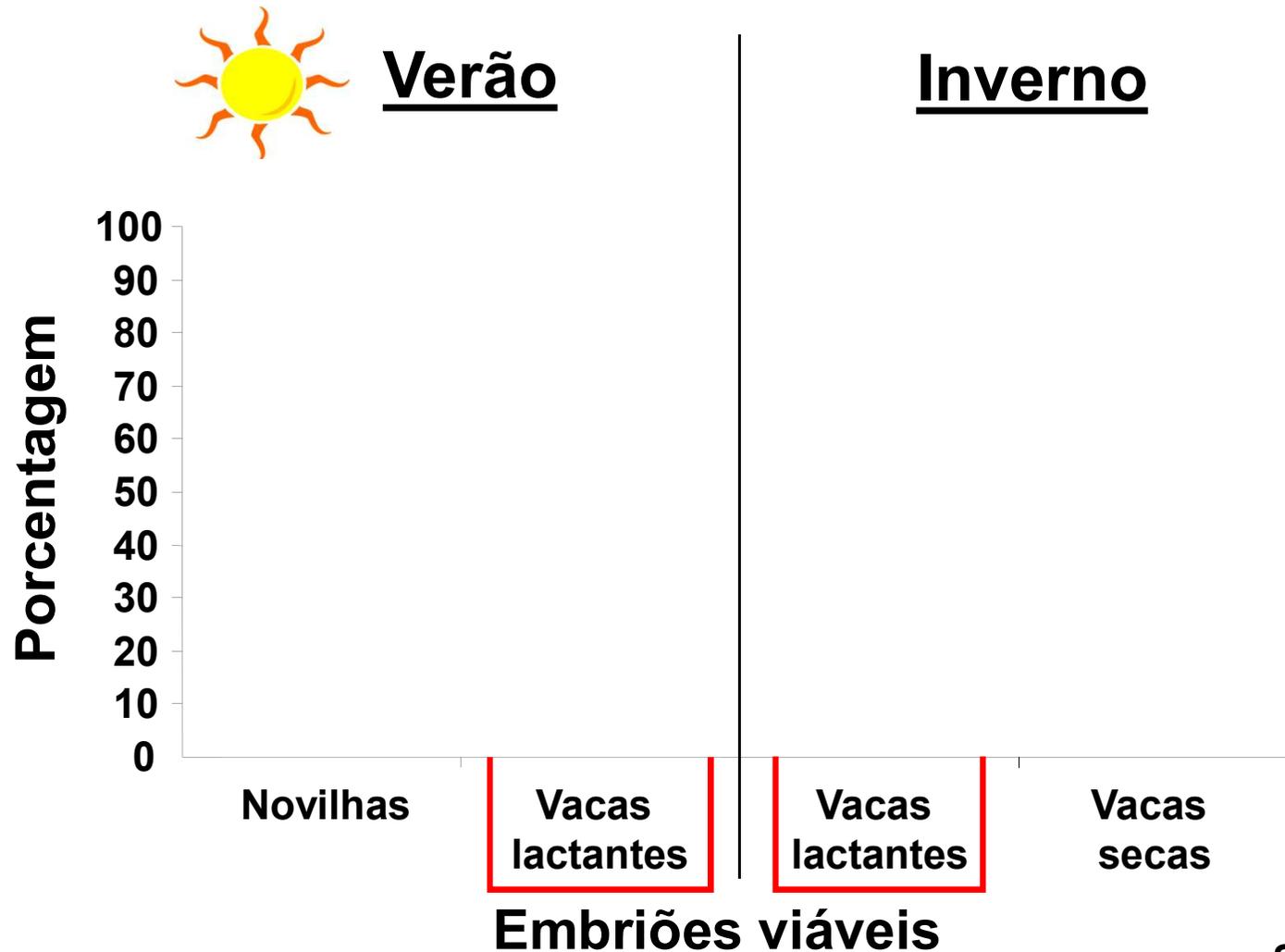
↓ **Menor IMS**
↑ **Controle da temperatura corporal**



Fecundação de embriões de acordo com a estação do ano

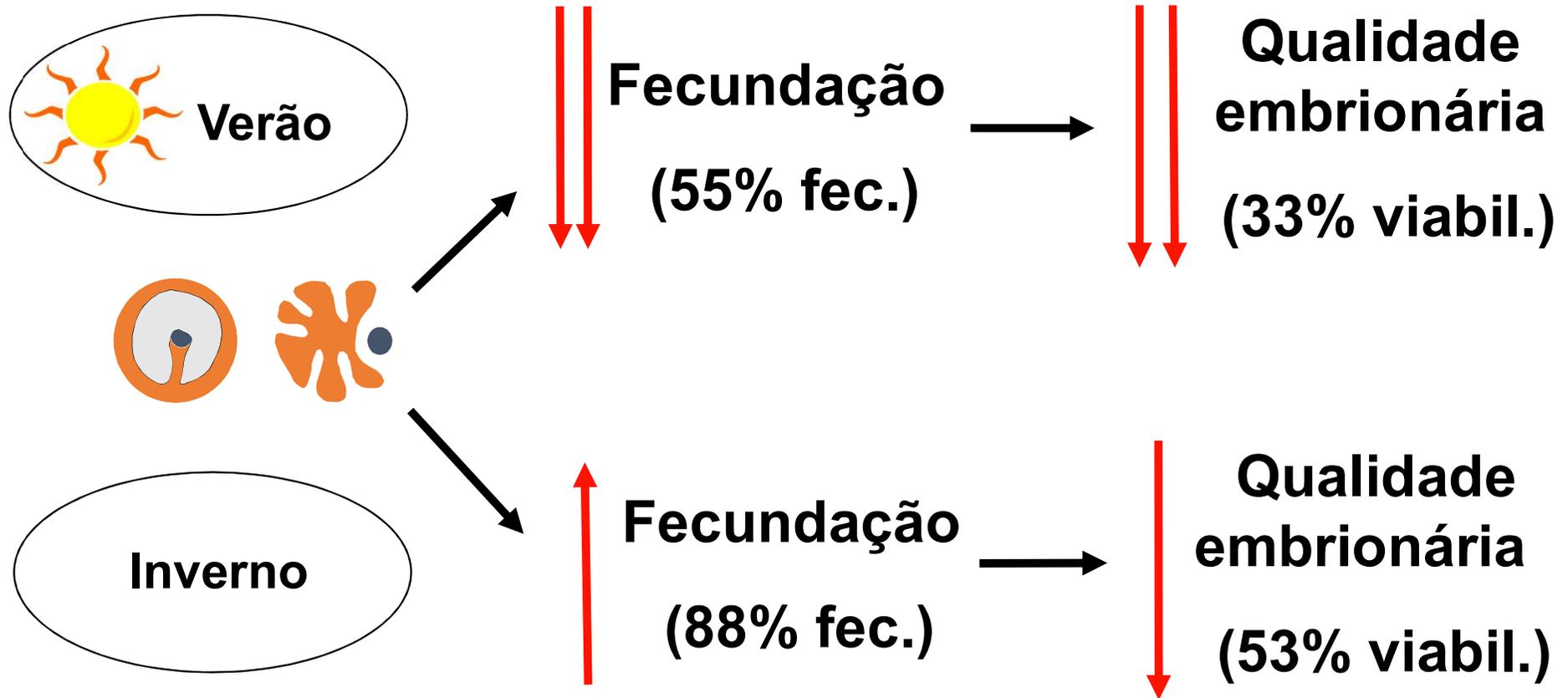


Número de embriões viáveis de acordo com a estação do ano

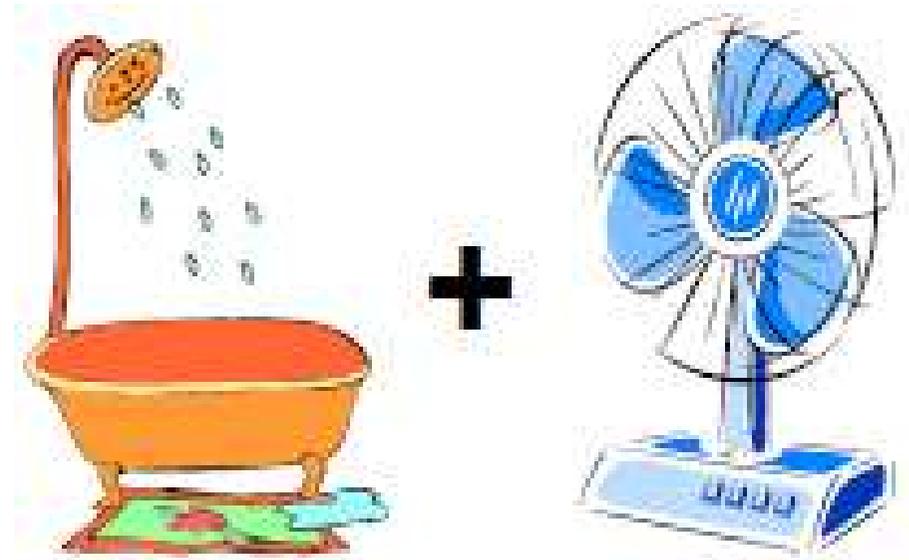


Sartori et al. (2002)

Vacas leiteiras com alta produção de leite



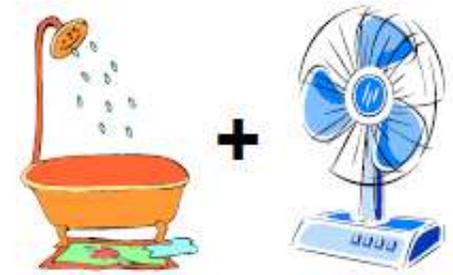
O que podemos fazer??



O que podemos fazer??

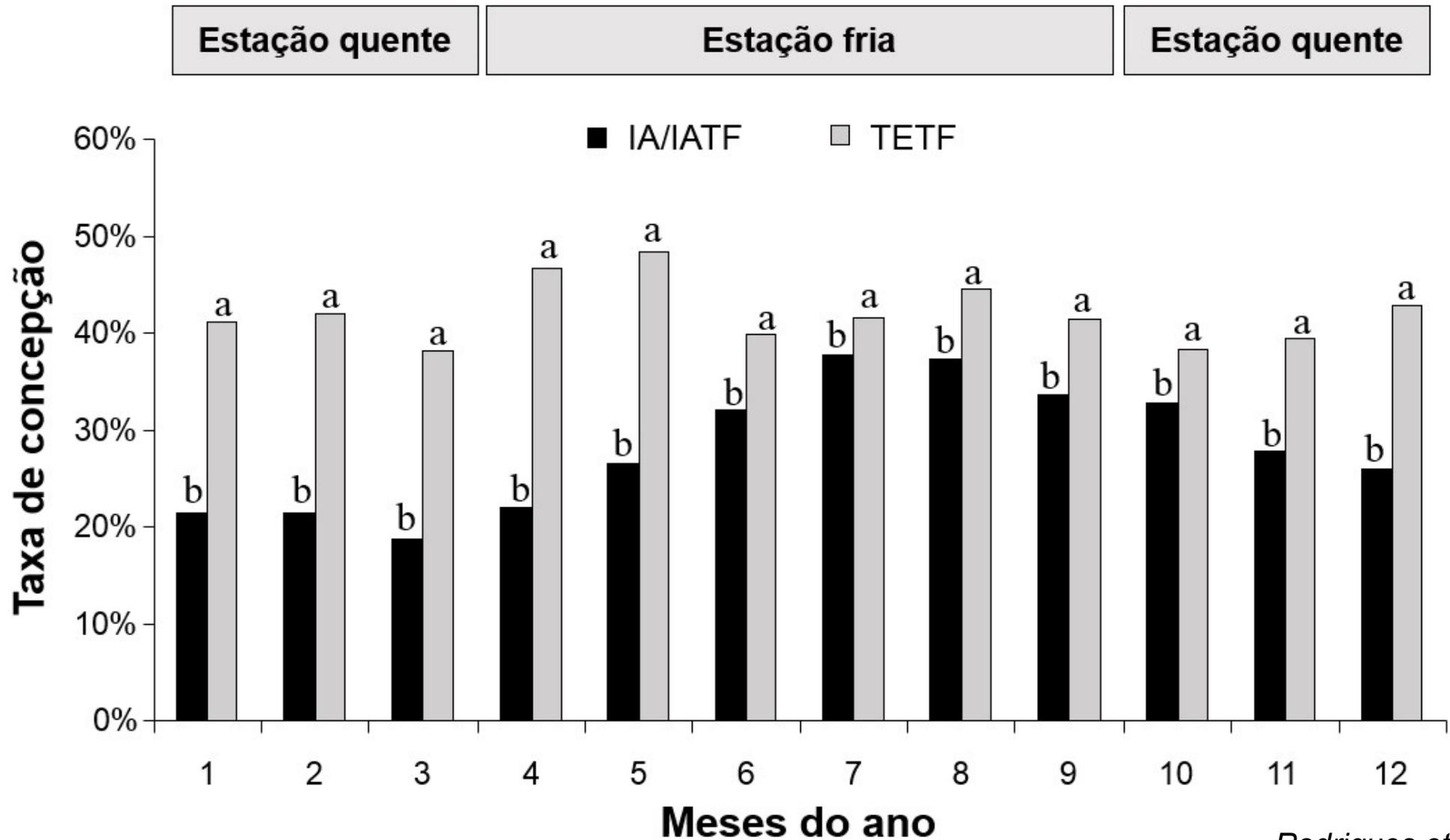


O que podemos fazer??



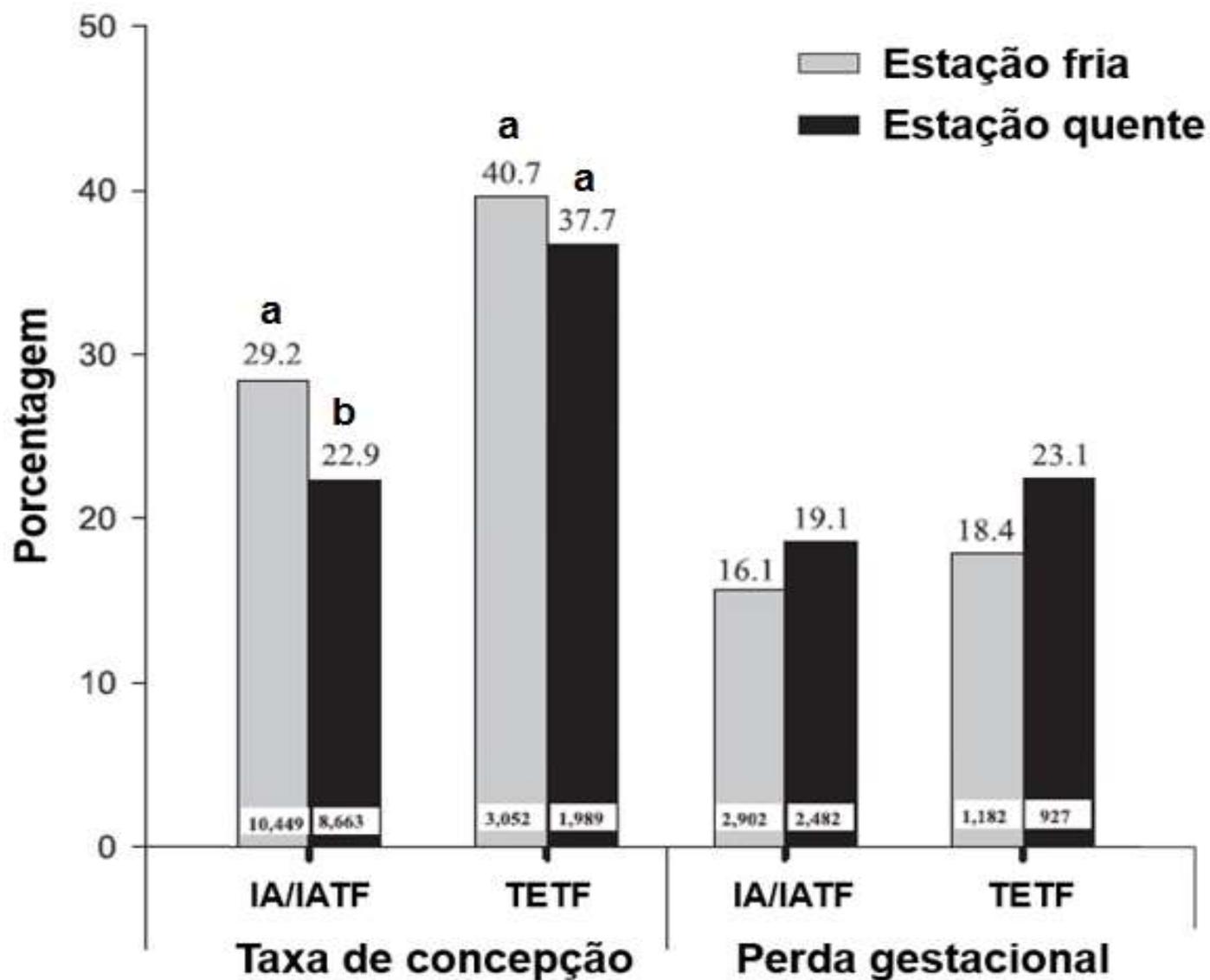
Fazenda Colorado

IA/IATF ou TETF em diferentes estações do ano

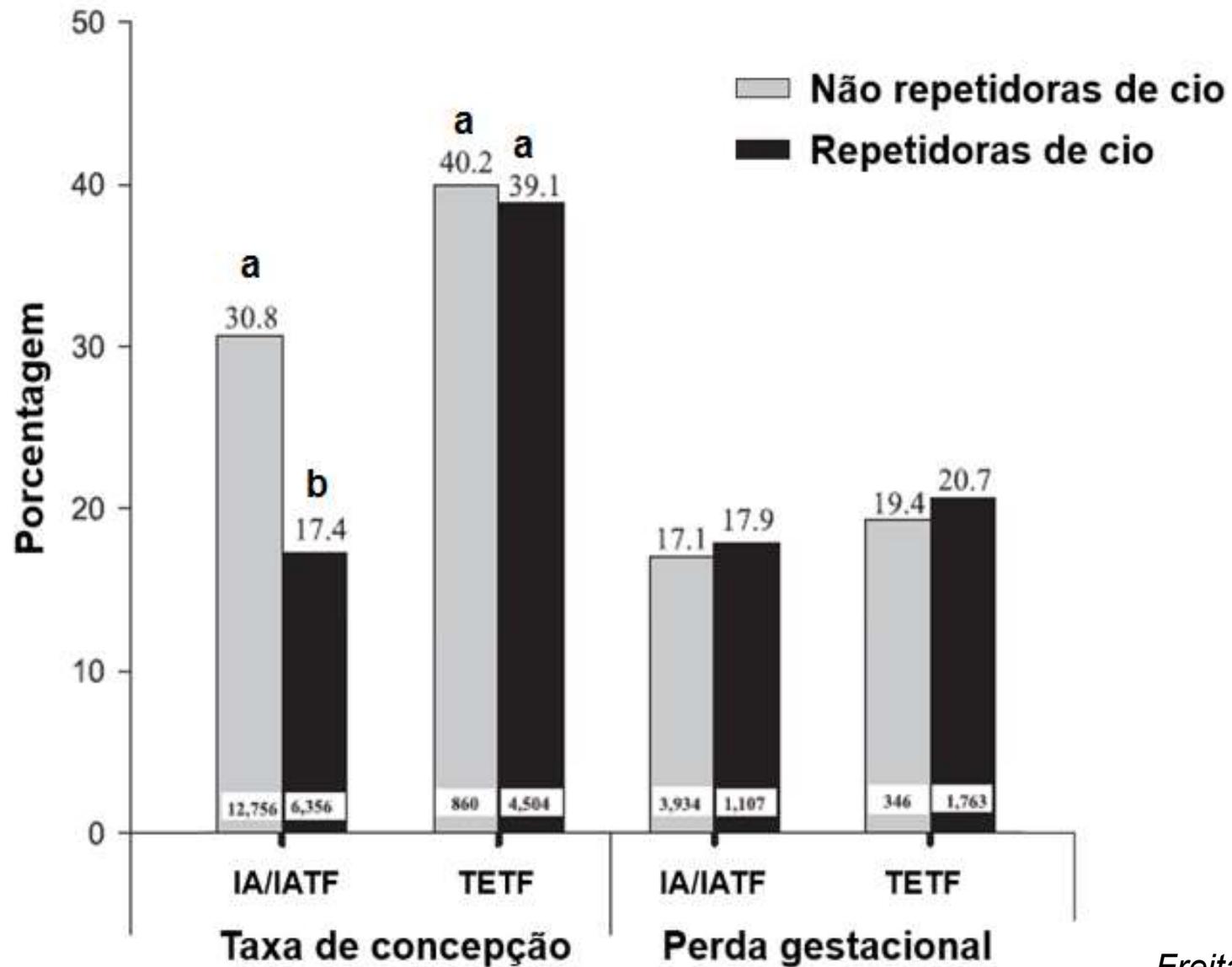


Rodrigues et al. (2007)

IA/IATF ou TETF em diferentes estações do ano



IA/IATF ou TETF em vacas repetidoras de cio



Considerações – SOV, PIVE e TETF

- ✓ **A SOV ou PIVE e TETF envolve o conceito de maximizar o uso do material genético da fêmea**
- ✓ **Aumenta a eficiência reprodutiva por aumentar o número de descendentes que uma fêmea pode gerar em sua vida útil**
- ✓ **Possui um potencial uso estratégico em estações quentes do ano e em vacas repetidoras de serviço**
- ✓ **Mais laboriosa e exigente que a IA e IATF**

**Uso de sêmen sexado
na reprodução de bovinos**

Uso de sêmen sexado na reprodução de bovinos

✓ Vantagens do uso de sêmen sexado

- Direcionamento do sexo do nascimento das progênes
- Estratégia para aumento de rebanho (ex. leite)
- Estratégia de nascimento de machos (ex. corte) → bem menos usado
- Uso em produção de embriões (ex. leite)

✓ Limitações

- Custo maior com relação ao sêmen convencional
- Resultados na IA, IATF e produção de embriões inferiores ao convencional

P/IA de sêmen convencional vs. sexado

Estudo	Categoria	Convencional	Sexado	Relação
Sá Filho et al. (2012)	Vacas de corte	54,2 (232/428)	45,4 (193/425)	83,7
Sá Filho et al. (2012)	Vacas de corte	54,7 (134/245)	45,9 (113/246)	83,9
Sales et al. (2011)	Vacas de corte	51,8 (100/193)	41,8 (82/196)	80,7
Sales et al. (2011)	Vacas de corte	55,3 (105/190)	40,9 (79/193)	74,0
Souza et al. (2006)	Vacas leiteiras	27,1 (44/162)	13,0 (21/161)	48,0
Seidel and Schenk (2008)	Novilhas de corte	67,6 (96/142)	53,7 (130/242)	79,4
Seidel and Schenk (2008)	Novilhas de corte	67,0 (85/126)	52,6 (129/245)	78,5
Dominguez et al. (2011)	Vacas e novilhas de corte	57,9 (188/325)	38,8 (131/338)	67,0
DeJarnette et al. (2011)	Novilhas leiteiras	60,0 (1.375/2.292)	38,0 (881/2.319)	63,3
Mellado et al. (2010)	Vacas e novilhas leiteiras	37,7 (160/426)	22,9 (51/223)	60,7
DeJarnette et al. (2009)	Novilhas leiteiras	56,0 (30.082/53.718)	45,0 (17.893/39.763)	80,3
Bodmer et al. (2005)	Vacas e novilhas leiteiras	37,4 (34/91)	28,8 (38/132)	77,0
Andersson et al. (2006)	Vacas leiteiras	46,0 (69/149)	21,0 (33/157)	45,6
Seidel and Schenk (2008)	Novilhas leiteiras	60,0 (74/124)	46,7 (114/244)	77,8
Seidel and Schenk (2008)	Novilhas leiteiras	62,0 (163/263)	42,1 (225/534)	67,9
Geral	-	56,0 (32.941/58.874)	44,3 (20.113/45.418)	79,1

P/IA de sêmen sexado de acordo com o horário de inseminação no protocolo de IATF

Estudo	Categoria	IA convencional	IA atrasada (6-8h)	P
Shenck et al. (2009)	Novilhas Angus	34.4 (11/32)	48.6 (17/35)	>0,10
Neces et al. (2010)	Vacas Nelore	20.8 (27/130)	30.9 (38/123)	<0,05
Sales et al. (2011)	Vacas Nelore	42.8 (100/193)	50.8 (99/195)	0,11
Sales et al. (2011)	Novilhas Jersey	16.2 (17/105)	31.4 (32/102)	<0,01
Geral	-	33.7 (155/460)	40.9 (186/455)	<0,01

Adaptado de Sá Filho et al. (2014)

Produção de embriões *in vivo* de novilhas Holandesas
de acordo com **tipo e dose de sêmen,**
e esquema de inseminação após detecção de cio

Estudo	Sex (20x10⁶) 1 IA, 12 pós cio	Sex (10x10⁶) 2 IA, 12 e 24 h pós cio	Con (10x10⁶) 2 IA, 12 e 24 h pós cio
N	12	13	14
Estruturas	6,8 ^b	8,9	9,9 ^a
Fertilizados	3,8 ^b	4,9 ^b	8,7 ^a
% de fertilizados	63,5 ^b	61,9 ^b	90,9 ^a
Viáveis	1,9 ^b	2,3 ^b	6,3 ^a
% de viáveis	24,3 ^b	30,8 ^b	71,3 ^a

Sartori et al. (2004)

Produção *in vivo* de embriões de **vacas Nelore**
de acordo com o **tipo de sêmen** [Conv. (40 mi sptz/IA) vs. Sex. (4.2 mi sptz/IA)]
e **horários de inseminação** (12 e 24 ou 18 e 30 h após indução da ovulação)

Estudo	Convencional 12 e 24 h	Sexado 12 e 24 h	Sexado 18 e 30
N	17	18	19
Estruturas	8,0	7,1	9,0
Não fertilizados	0,5 ^b	3,7 ^a	2,9 ^a
Transferíveis	6,8 ^a	2,4 ^c	4,5^b
% de transferíveis	86,1 ^a	37,3 ^c	48,2^b

Soares et al. (2011); Sá Filho et al. (2014)

Produção *in vivo* de embriões de **vacas Holandesas**
de acordo com o **tipo de sêmen** [Conv. (40 mi sptz/IA) vs. Sex. (4.2 mi sptz/IA)]
e **horários de inseminação** (12 e 24 ou 18 e 30 h após indução da ovulação)

Estudo	Convencional 12 e 24 h	Sexado 12 e 24 h	Sexado 18 e 30
N	11	11	11
Estruturas	10,4	11,3	12,4
Não fertilizados	0,9 ^b	5,2 ^a	4,6 ^a
Transferíveis	8,7 ^a	4,6 ^b	6,4^{ab}
% de transferíveis	85,9 ^a	40,7 ^c	54,2^b

Soares et al. (2011); Sá Filho et al. (2014)

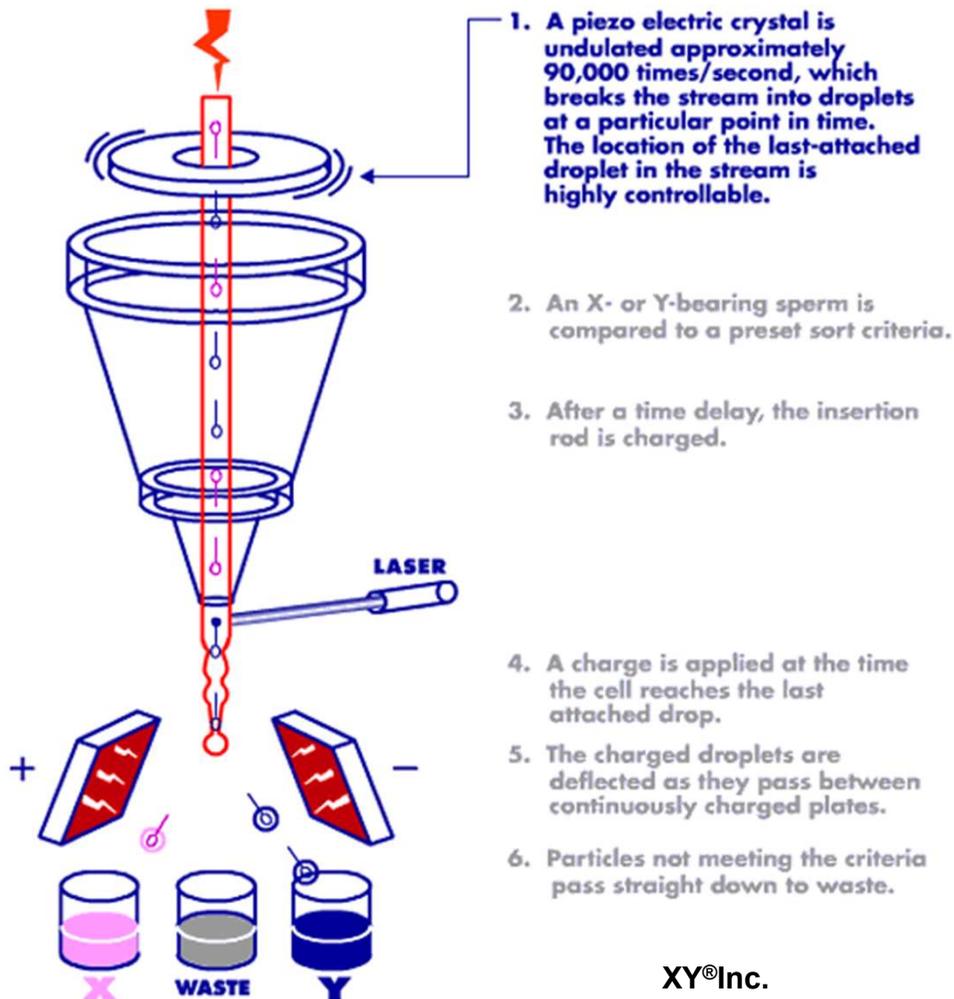
A diferença no conteúdo/tamanho do DNA entre o sptz X e Y é de 4% no bovino

O corante marcador Hoechst 33342 se difunde pela membrana e se liga nos pares de base A/T, gerando uma fluorescência no espectro de 350-460 nm

A citometria de fluxo quantifica a diferença de DNA através de detectores que mensuram a intensidade do sinal quando a célula é excitada por um laser

O processador permite a passagem de um único sptz por uma gota a qual aplica diferentes cargas para o sptz X e Y

Os sptz X e Y, assim como os mortos ou de baixa qualidade, são então separados quando a gota passa entre placas carregadas com cargas opostas, as quais separa-os



Uma opção disponível (aparentemente) pensando em aumentar a eficiência do uso de sêmen sexado

Processos de sexagem espermática

Até 20 etapas até o congelamento vs. 3-4 do sêmen convencional

(Cada processo é um desafio físico e bioquímico para o sptz)



Renovação completa nos meios utilizados nos processos
(preparação inicial para coloração, fluido da palheta e congelamento...)

Objetivo: Ser menos prejudicial para o sptz em termos de condições de pH e estresse oxidativo durante o processo de sexagem...

Além disso, a dose inseminante é de 4 milhões de sptz / palheta

Taxa de não retorno 56 d pós IA de novilhas inseminadas com sêmen convencional, sexado e sexado Ultra (diferentes doses)

Tratamento	N	Taxa de não retorno aos 56 d pós IA, %	Proporção do convencional
Sexado (2,1 x 10 ⁶)	1.953	55,9	84,1%
Sexado Ultra (2,1 x 10 ⁶)	1.999	59,9	90,1%
Sexado Ultra (3,0 x 10 ⁶)	2.013	60,0	90,2%
Sexado Ultra (4,0 x 10 ⁶)	1.890	66,7	100,3%
Convencional (15 x 10 ⁶)	62.398	66,5	-

Ejaculados de 5 touros dividido nos 4 tratamentos de sexado e comparado com sêmen convencional de ejaculados contemporâneos dos mesmos touros

Exemplo de uso estratégico e direcionado de sêmen sexado em fazenda leiteira (1 ano reprodutivo)

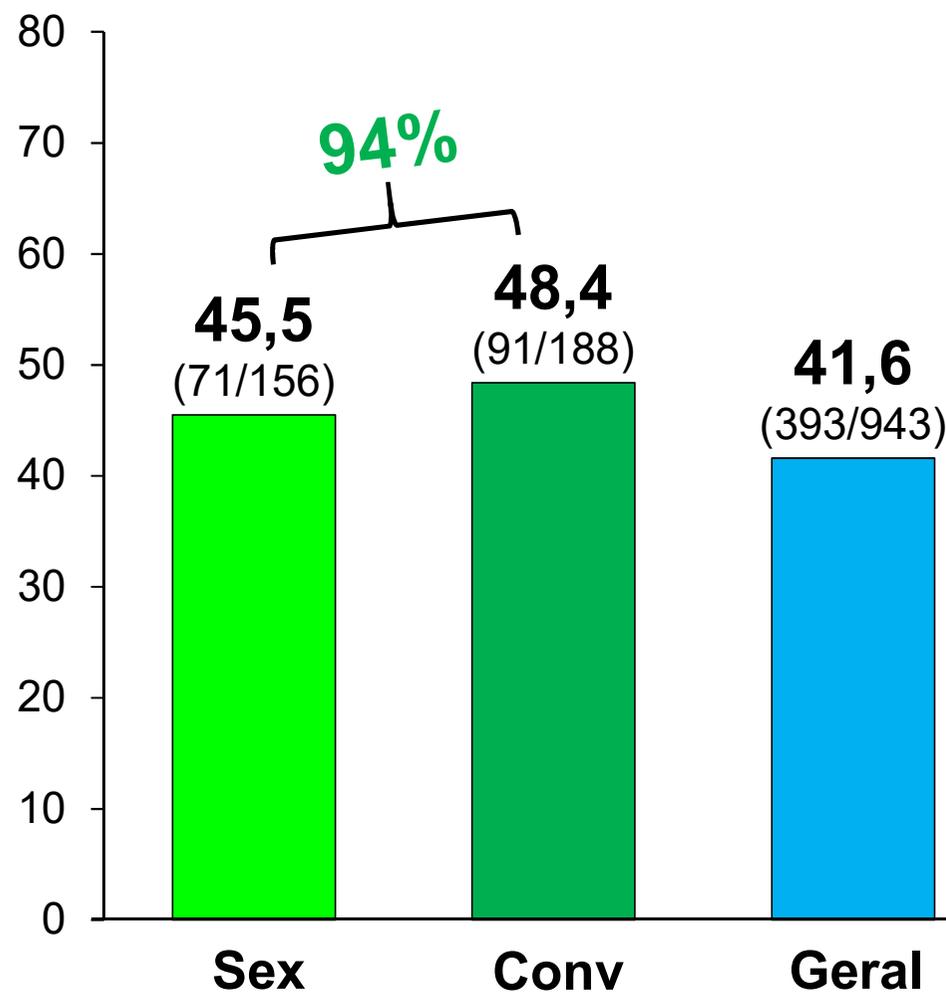
- ✓ São Pedro - SP
- ✓ 400 vacas em lactação
- ✓ 39,0 kg/d
- ✓ TP-21d >30%
- ✓ Mesmos protocolos de IATF
- ✓ Touro sexado ULTRA utilizado

Somente na primeira IATF pós-parto

Somente vacas que expressaram cio ao final do protocolo

Vacas sem problemas severos de saúde no pós-parto

66 primíparas, 72 secundíparas, 22 de 3° cria e 4 de 4° cria



Consentini, C. E. C. Gonzalez, B., Sartori, R.

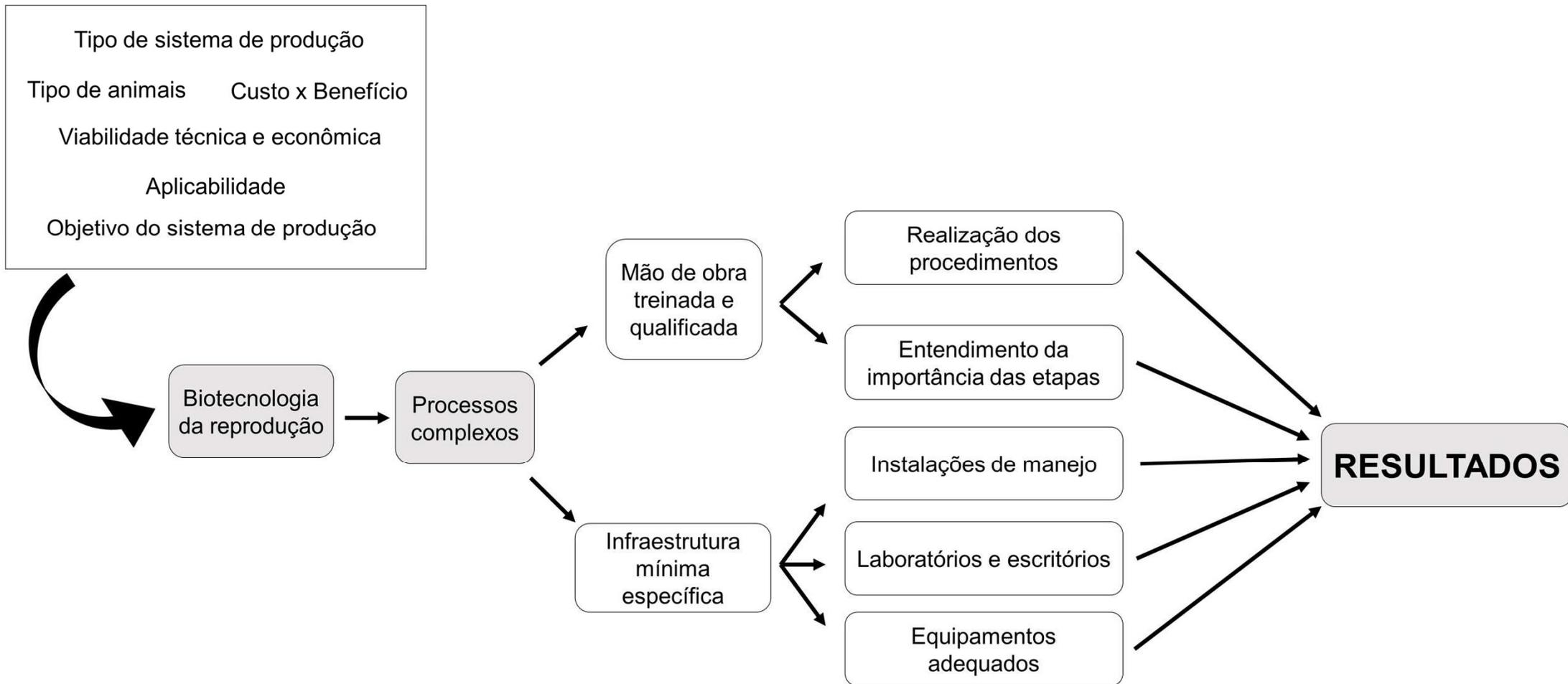
Exemplo do impacto do touro na produção de embriões *in vivo* de vacas holandesas secas

Item	Touros UltraFertility	Touros não-UltraFertility
N de flushing	19	21
Taxa de recuperação, %	69,3	62,0
Estruturas totais por doadora, n	8,95	7,9
% de não fecundado por doadora	10,8	42,8
Viáveis por doadora, n	5,6	2,1
% de viáveis por doadora	67,7	29,4
Congeláveis por doadora, n	5,2	2,0
% de congeláveis por doadora	63,4	28,4

Considerações – Sêmen sexado

- ✓ **O uso de sêmen sexado possibilita o direcionamento do sexo da progênie e é maior em sistemas de produção de leite**
- ✓ **De maneira geral, a P/IA ou a produção de embriões é menor quando se usa sêmen sexado comparado com sêmen convencional**
- ✓ **Uso de sêmen sexado de touros de alta fertilidade, assim como o uso direcionado em classes de fêmeas com maior probabilidade de emprenhar, podem otimizar o uso do sêmen sexado no sistema de produção**

Considerações Finais





Thank You
FARMERS

Carlos Eduardo Cardoso Consentini

carlos.consentini@usp.br

19 9 9826 2082

robertosartori@usp.br

