

Suinocultura

INDUSTRIAL.COM.BR

Nº 04/2016 | Ano 38 | Edição 271 | R\$ 26,00

Gessulli
AGRICULTURE
REFERÊNCIA E INOVAÇÃO

O USO DA BIOTECNOLOGIA NA REPRODUÇÃO DE SUÍNOS

Estudo realizado na Embrapa Suínos e Aves aponta os caminhos e possibilidades que o uso da biotecnologia pode abrir para a suinocultura no futuro.



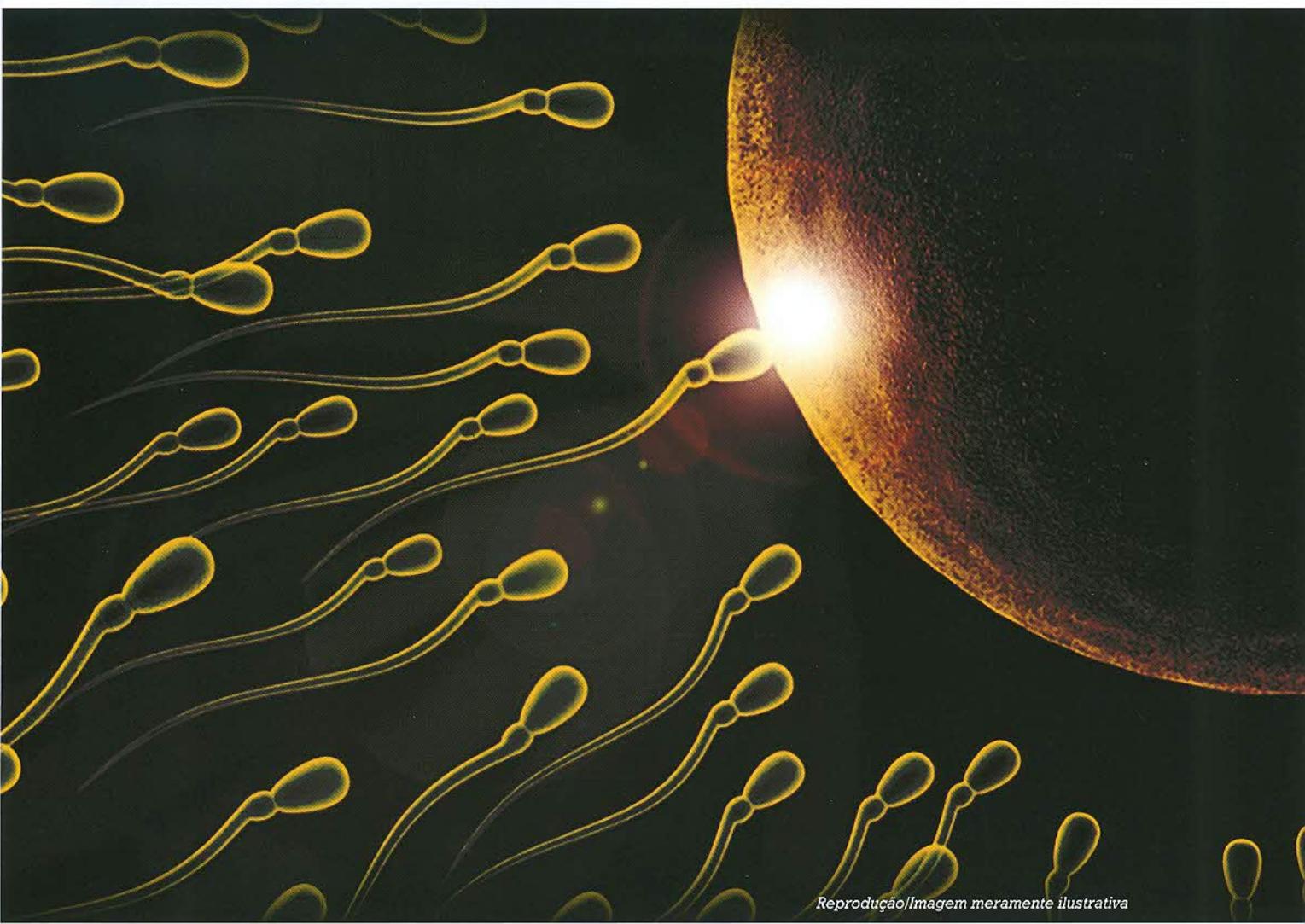
ENTREVISTA

Os desafios e oportunidades do agronegócio brasileiro pautam a conversa com o ex-ministro da Agricultura Roberto Rodrigues.

CAMINHOS DA BIOTECNOLOGIA NA REPRODUÇÃO EM SUÍNOS

Artigo descreve algumas das biotecnologias que estão sendo aprimoradas e podem abrir novas possibilidades para a reprodução na espécie suína.

Por Andressa Pereira de Souza¹, Zigomar da Silva², Bruna Ferrari Vieira Superti³, Mariana Groke Marques⁴



Reprodução/Imagem meramente ilustrativa

Na suinocultura atual pode-se encontrar diversos cenários para a utilização das biotecnologias da reprodução. Enquanto ainda temos granjas que apresentam problemas de detecção de cio e acondicionamento de sêmen, também encontramos granjas altamente tecni-

ficadas, que absorveram rapidamente as tecnologias da reprodução a pouco desenvolvidas para a espécie suína. Assim, as constantes pesquisas em biotecnologias, tanto para compreendê-las melhor, levando ao seu aprimoramento para a utilização destas pelo produtor, quanto para o desenvolvimento de novas, são bastante

relevantes. Neste artigo, iremos descrever algumas das biotecnologias que estão sendo aprimoradas, podendo abrir novas possibilidades para a reprodução na espécie suína.

SÍNCRONIZAÇÃO DO CICLO ESTRAL

Com vários tipos de protocolos, que permitem sincronizar até o momento da ovulação, pode proporcionar a inseminação em "tempo fixo", ou seja, em momento pré-definido, sem a necessidade de detecção de cio. Esta é uma biotecnologia promissora, principalmente no cenário em que vivemos hoje de mão de obra reduzida e com alto custo.

A utilização da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em suínos visa minimizar os erros associados com a detecção de cio, reduzindo a variação entre o cio e o intervalo de ovulação, além da possível diminuição do número de doses de sêmen por fêmea, diminuindo os custos de produção, apesar do custo dos hormônios. Esta técnica, mesmo sendo promissora, ainda gera alguns receios para sua utilização, sendo entre estes, possíveis alterações no sistema reprodutor feminino que poderiam ser causadas pela estimulação com hormônios exógenos.

Em estudos recentes, realizados pelo nosso grupo de pesquisa, observou-se que a utilização tanto do eCG (gonadotrofina coriônica equina), que promove a estimulação do desenvolvimento folicular, quanto a sua combinação com GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) como indutor de ovulação, não alteraram a expressão de genes relacionados com a formação do corpo lúteo e produção de progesterona. Além disso, o uso destes hormônios não alteraram a expressão de importantes receptores hormonais relacionados com o desenvolvimento uterino (dados não publicados), apresentando assim mais informações que corroboram para a utilização com segurança desta biotecnologia.

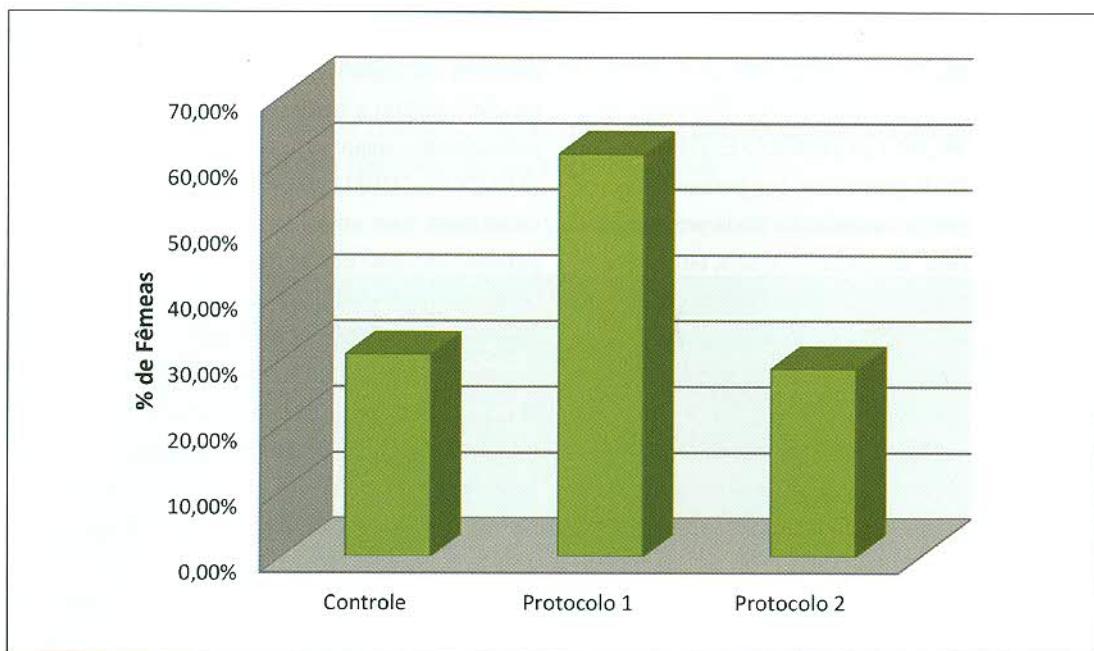
A melhoria do controle do ciclo estral com hormônios exógenos também auxilia na utilização de outras ferramentas como a utilização do sêmen criopreservado, o que viabiliza a importação de sêmen de outros países, apoiando o desenvolvimento de programas nacionais de melhoramento genético.

CONGELAMENTO DE SÊMEN

Diferenças estruturais da bicamada lipídica e alterações semelhantes às ocorridas no espermatozoide no momento da capacitação, denominada de "criocapacitação", ajudam a explicar a alta sensibilidade do espermatozoide suíno ao processo de criopreservação (BAILEY, BILODEAU e CORMIER, 2000). Esses fatores corroboram para um curto período de viabilidade espermática no trato genital feminino quando comparado com o sêmen resfriado, no qual se estima que este período seja de 24 horas. Assim, para que se obtenham melhores resultados de fecundação, a inseminação das fêmeas com sêmen congelado deve ser realizada no momento mais próximo possível da ovulação.

Desta forma, foi proposto um estudo visando a melhoria dos resultados com sêmen congelado associando este com a sincronização do ciclo estral. Foram comparados dois protocolos de sincronização e um grupo controle (fêmeas que não receberam nenhum tipo de aplicação hormonal). No protocolo 1, as fêmeas que tiveram o desenvolvimento folicular estimulado pela aplicação de 600 UI de eCG no momento do desmame e a indução da ovulação pela aplicação de 50 µg de GnRH 80 horas após a aplicação da eCG. No protocolo 2, as fêmeas que tiveram o desenvolvimento folicular estimulado pela aplicação de 600 UI de eCG no momento do desmame e a indução da ovulação pela aplicação de 50 µg de GnRH 56 horas após a aplicação da eCG. No grupo controle, as inseminações foram realizadas 24 horas após o início do cio e nas fêmeas dos protocolos 1 e 2 foram realizadas 36 horas após a aplicação do indutor da ovulação. Foi utilizado o método da inseminação artificial pós-cervical com dose inseminante média de 1,5 bilhão de espermatozoides móveis pós-descongelamento. Como demonstrado no gráfico 1, o protocolo 1 apresentou resultados bastante positivos, mostrando que 61,19% das fêmeas não retornaram ao cio após 28 dias da IA, sendo mais eficiente que o grupo que não recebeu hormônios exógenos (controle - 30,76%) e que grupo que recebeu o protocolo 2 (28,57%) (dados não publicados). Desta forma, abre-se uma nova perspectiva para a utilização de sêmen congelado, com resultados bastante animadores.

GRÁFICO 01. ÍNDICES DE NÃO RETORNO AO CIO DE FÊMEAS SUBMETIDAS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE IATF E INSEMINADAS COM DOSE ÚNICA DE SÊMEN CONGELADO



AVALIAÇÃO SEMINAL POR CITOMETRIA DE FLUXO

O desenvolvimento de tecnologias de avaliação seminal que aumentem a acurácia da predição da fertilidade da dose inseminante pode acarretar na redução do número de espermatozoides utilizados por dose, fato este que produziria um forte impacto econômico. Alguns dos testes para avaliação espermática utilizados em centrais de produção de sêmen de suínos consistem basicamente da análise subjetiva da motilidade, concentração e morfologia. O desenvolvimento de ferramentas que colaborem para novas formas de avaliação dos componentes das células espermáticas pode auxiliar no aumento da predição da fertilidade.

A Citometria de Fluxo é uma técnica utilizada para contagem, classificação e análise de partículas microscópicas que se encontram suspensas em um meio aquoso e em fluxo. É uma forma de análise citológica que se beneficia por equipamentos modernos que têm seu funcionamento através de laser, interceptando cada partícula. A dispersão da luz fornece dados relativos ao tamanho e à granularidade da partícula o que permite maior precisão nos resultados, em um curto espaço de tempo, avaliando

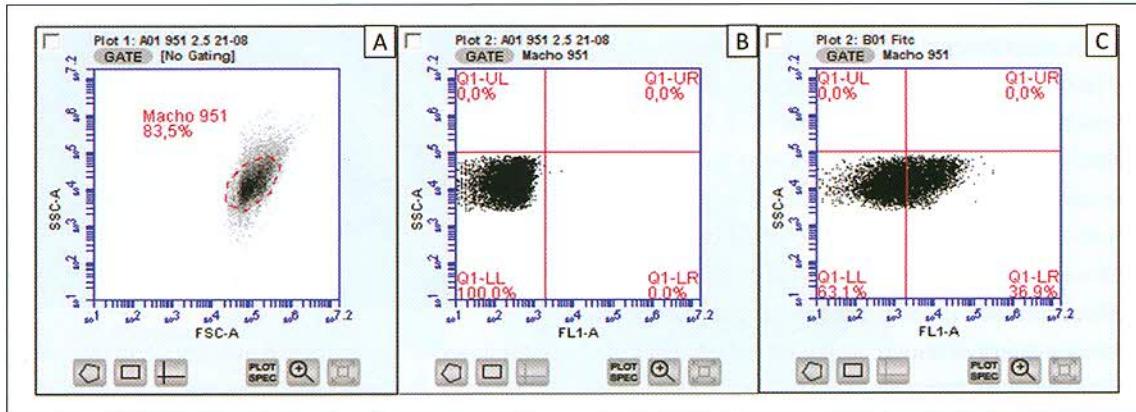
grande número de células com alta sensibilidade e especificidade.

Para que os vários compartimentos das células espermáticas possam ser avaliados, esse aparelho requer o uso de sondas fluorescentes. Daremos, a seguir, exemplos de sondas a serem utilizadas para marcação dos principais compartimentos da célula espermática.

A sonda fluorescente FITC - PSA (FITC - *Pisum sativum aglutinina*) avalia integridade do acrossoma. Esta reage com α -manose e α -galactose da matriz acrossomal corando em verde amarelado fluorescente os espermatozoides lesados, enquanto que os com acrossoma íntegros não são corados (NETO; DODE, 2010). Em uma lâmina marcada e avaliada em microscópio de fluorescência, normalmente se faz a avaliação de 200 células espermáticas. Na figura 2 temos três plots de citometria de fluxo, mostrando espermatozoides marcados para a mesma sonda. Neste caso, em menos de um minuto é feita a avaliação de aproximadamente 10.000 células, aumentando assim a precisão da avaliação.

O JC-1 (6,6',6,6' tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbonianina iodeto), sonda que avalia atividade mitocondrial, depende de um gradiente eletro-

FIGURA 01. AVALIAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES SUÍNOS ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO. (A) ÁREA DEMARCADA CORRESPONDE A SELEÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES. (B) ESPERMATOZOIDES SEM MARCAÇÃO FLUORESCENTE OU “BRANCO”, UTILIZADO PARA PADRONIZAÇÃO DE AUTO FLUORESCÊNCIA DE CADA AMOSTRA. (C) ESPERMATOZOIDE INCUBADOS COM FITC-PSA. O QUADRANTE LL REPRESENTA OS ESPERMATOZOIDES QUE NÃO EMITIRAM FLUORESCÊNCIA, SENDO CONSIDERADOS INTEGROS. NO QUADRANTE LR, ESPERMATOZOIDES QUE TIVERAM MARCAÇÃO FLUORESCENTE E SÃO CONSIDERADOS COM ACROSSOMA LESADO



químico altamente negativo na membrana mitocondrial para penetrar na organela e emitir fluorescência verde ou vermelha de acordo com a concentração interna final. Cor vermelha caracteriza mitocôndria funcional, enquanto que concentrações baixas ou mitocôndrias afuncionais apresentam-se na coloração verde.

A sonda PI (do inglês, *propidium iodide*) é utilizada para avaliar a integridade da membrana plasmática. Quando íntegra, a membrana plasmática de espermatozoides é impermeável ao PI e o espermatozoide não fica marcado, porém quando esta é lesionada, o PI consegue penetrar na célula, corando o núcleo em vermelho.

A sonda Laranja de Acridina permite avaliar a integridade do DNA espermático, quando o DNA é dupla-fita (normal) este é marcado em verde por esta sonda e a marcação em vermelho-alaranjado é observado para DNA desnaturalizado ou fita simples.

Quando os espermatozoides lesados estão em maior número consequentemente os machos serão menos férteis, já que as estruturas danificadas têm papel fundamental na fusão e penetração com o óvulo. Por exemplo, estudos já demonstraram que a avaliação por citometria de fluxo dos danos no DNA em amostras de sêmen suíno armazenado é um fator útil para avaliar o sêmen, como um indicador para o tamanho da leitegada e taxa de parto (BROEKHUIJSE *et al.*, 2015).

FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

Amplamente aplicada na bovinocultura, mas ainda em fase de pesquisa e desenvolvimento na suinocultura, tem-se a técnica de produção de embriões *in vitro* (PIV). Além de ser uma possível ferramenta para avaliação de fertilidade em machos, a produção de embriões *in vitro* em suínos vem se desenvolvendo com o intuito de produzir embriões. No entanto, a produção ainda é considerada abaixo do ideal, sendo os índices de embriões que atingem o estágio de blastocisto são em média de 20% a 30%. Neste aspecto a espécie suína apresenta dois problemas que precisam ser resolvidos: os altos índices de polispermia e menores índices e qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro*, quando comparadas aos *in vivo*.

A produção *in vitro* de embriões consiste basicamente de três etapas realizadas sob condições controladas: maturação *in vitro* (MIV), a qual compreende os complexos mecanismo de maturação oocitária; fertilização *in vitro* (FIV), que envolve a capacitação espermática e penetração do espermatozoide no oócito maturado; e cultivo *in vitro* (CIV) do presumível zigoto.

Na espécie suína existem várias aplicações para a PIV, dentre as quais pode-se citar: incremento no progresso genético pelo melhoramento do potencial dos gametas femininos, ou do melhor uso dos reprodutores; a produção de embriões de alto valor genético pela fecun-

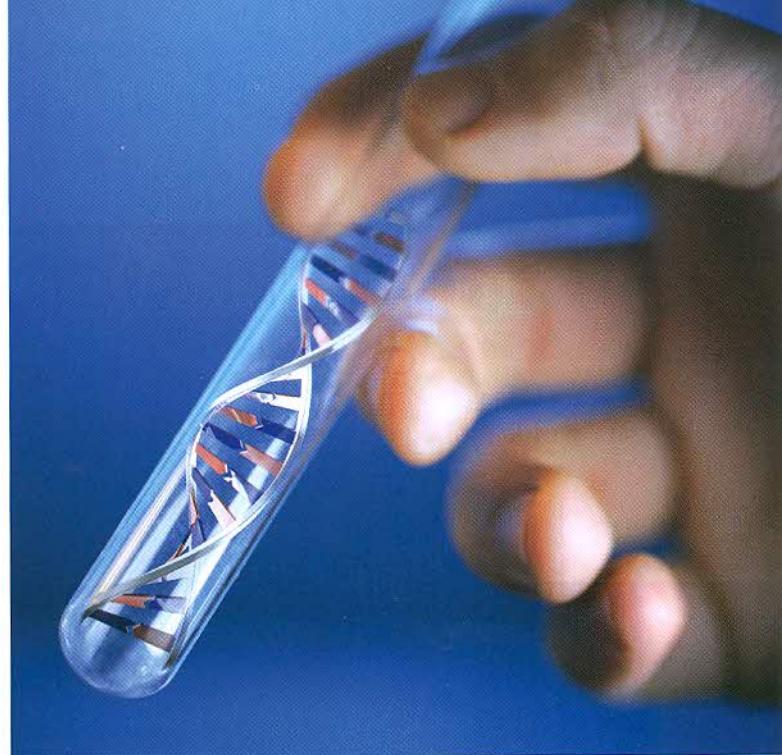
dação com espermatozoides sexados ou congelados; a produção de embriões em estágios determinados para a transferência e congelamento, o estabelecimento de bancos de genes (congelamento de gametas femininos e masculinos) e a redução do número de animais utilizados para experimentos (VISSCHER *et al.*, 2000).

Outra possibilidade de aplicação desta técnica é testar previamente a capacidade fecundante do sêmen de cachaços a serem utilizados na IA. A fecundação *in vitro* é o método que melhor mimetiza as interações que ocorrem entre os gametas masculino e feminino *in vivo* e poderia ser considerado como o teste mais informativo para avaliar o potencial fecundante dos espermatozoides *in vivo*. Índices de penetração de óócitos, número de espermatozoides aderidos por óócitos, índices de formação do pronúcleo masculino e o potencial de produção de embriões em *in vitro*, são alguns dos parâmetros da FIV que estão correlacionados com a fertilidade *in vivo* dos suínos (FOXCROFT *et al.*, 2008).

Desta forma a produção *in vitro* de embriões suínos pode ser uma ferramenta adicional para selecionar reprodutores em centrais de inseminação, uma vez que os métodos tradicionais de avaliação seminal não oferecem esta informação de forma direta. Além das vantagens econômicas, a produção *in vitro* de embriões em suínos, permite o aprimoramento dos conhecimentos em fisiologia da maturação oocitária, fecundação e cultivo embrionário, servindo como suporte para o avanço das biotécnicas da reprodução como a inseminação artificial, transferência de embriões, sincronização do ciclo estral, transferência nuclear e transgenia.

TRANSGENIA NA SUINOCULTURA

A transgenia permite a alteração de genes de interesse no genoma animal, que poderá resultar em inúmeras aplicações que envolvem desde a pesquisa básica à produção agropecuária, conhecimentos que podem ser traduzidos em qualidade de vida.

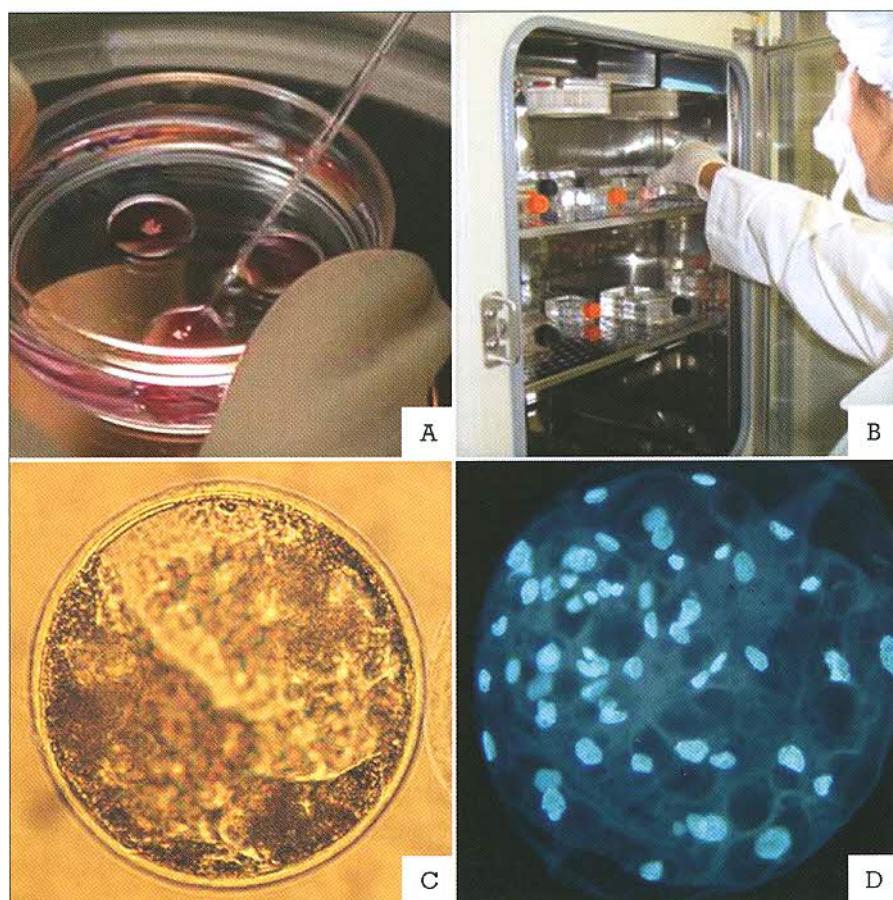


ras aplicações que envolvem desde a pesquisa básica à produção agropecuária, conhecimentos que podem ser traduzidos em qualidade de vida. Nesse contexto, a espécie suína se destaca como forte candidata a tecnologia transgênica, uma vez que os suínos crescem rapidamente, atingindo sua maturidade em um

curto espaço de tempo e são altamente produtivos (RUMPF; MELO, 2005). No setor produtivo, a tecnologia transgênica pode ser uma grande aliada da suinocultura, atendendo a programas de melhoramento genético com rápida multiplicação de animais com características desejáveis, diminuindo o impacto ambiental, aumentando resistência a doenças e tornando-os mais saudáveis.

Além do interesse zootécnico pela espécie, há um crescente interesse na pesquisa biomédica, pelo fato de haver grande similaridade do tamanho, fisiologia e metabolismo dos órgãos, bem como na sequência de genes, com o ser humano. Modificações direcionadas no genoma do suíno podem possibilitar que estes animais produzam tecidos ou proteínas de interesse médico e ainda sejam modelos animais para estudo de doenças humanas.

FIGURA 02. A) PLACA COM MICROGOTAS PARA CULTIVO DE EMBRIÕES SUÍNOS *IN VITRO*. B) INCUBADORA PARA CULTIVO DE EMBRIÕES. C) EMBRIÃO SUÍNO PRODUZIDO *IN VITRO*. D) EMBRIÃO SUÍNO MARCADO COM SONDA FLUORESCENTE HOECHST 33342, OS BLASTÔMEROS ESTÃO MARCADOS EM AZUL



Porém a transgenia está avançando a passos curtos, a microinjeção, a mais comum das metodologias, produz aproximadamente 0,5% de suínos transgênicos (NAGASHIMA *et al.*, 2003). As atividades de pesquisa nesta área estão no início e o caminho a percorrer é longo e trabalhoso e o sucesso da técnica dependerá da superação das barreiras técnicas. Além disso, existem as questões de segurança para a população de proteínas e animais possivelmente produzidos. Todos os produtos têm que atender as questões éticas e morais, bem-estar animal, baixo risco alimentar, sanitário e ambiental, além de seguirem toda a regulamentação governamental e principalmente educação pública, sendo primordial o desenvolvimento de pesquisas para definir todas essas questões, a fim de assegurar sua aplicação futura.

CONCLUSÕES

Foram descritas aqui algumas das biotecnologias da reprodução aplicadas e que poderão ser usadas para implementação da produção animal. Várias destas biotecnologias da reprodução já estão disponíveis para utilização a campo. Outras são perspectivas para o futuro e possíveis aplicações da espécie suína em outras áreas, como no desenvolvimento de produtos para saúde humana. Cabe ao médico veterinário, conjuntamente com o produtor, avaliar qual a melhor a ser utilizada em cada situação levando em consideração principalmente a situação da granja e possíveis

custos e benefícios, tendo sempre em mente que boas condições sanitárias, de manejo e de alimentação são pré-requisitos para a aplicação de qualquer destas biotecnologias. ^{1,2,3,4}

As Referências Bibliográficas deste artigo podem ser obtidas no site de *Suinocultura Industrial* por meio do link: www.suinoculturaindustrial.com.br/biotecnologia271

¹Doutoranda da Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC

²Mestrando da Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC

³Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo

⁴Pesquisadora Embrapa Suínos e Aves