

## SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE SOBRE A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO*

**Thiago Vinicius Porfírio Serrilho<sup>1</sup>; Gustavo de Arruda Bezerra<sup>2</sup>; Bárbara Fachini Agostinho<sup>1</sup>; Fábio Luiz Bim Cavalieri<sup>3</sup>; Luiz Paulo Rigolon<sup>3</sup>**

**RESUMO:** O Experimento foi realizado na Fazenda Cesumar, de Outubro a Dezembro de 2006, objetivando avaliar o efeito da aplicação de Somatotrofina Recombinante Bovina (rBST) na produção de embriões *in vitro*. Foram realizadas 50 aspirações foliculares, utilizando 25 animais Nelore, sendo que 13 delas foram controles e 12 animais que receberam de 500 mg de rBST (- Boostin®, Shering) cinco dias antes da aspiração, 30 dias os animais foram invertidos de tratamento e realizada outra aspiração. Os folículos maiores que 3 mm foram aspirados com a auxílio de ultrason aloka SSD 500, e os oócitos avaliados e, posteriormente, maturados e fertilizados *in vitro* e os presumíveis zigotos cultivados por 192 horas-pós fertilização. Não houve efeito da aplicação do rBST cinco dias antes da aspiração na quantidade de oócitos viáveis, inviáveis, e totais, bem como no número de blastocistos expandido, e blastocistos eclodidos. Todavia, o número de embriões viáveis total foi maior ( $P<0,07$ ) nos animais que receberam o rBST. Desta forma a aplicação do rBST não influenciou no aumento do número de oócitos aspirados, mas aumentou o número de embriões viáveis produzidos.

**PALAVRAS-CHAVE:** oócitos, qualidade, quantidade, reprodução.

### INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões bovinos constitui-se em uma ferramenta que serve para aumentar o potencial reprodutivo das fêmeas consideradas excepcionais, principalmente, como instrumento para acelerar o progresso dos programas de seleção animal (GONÇALVES et al., 2002). O sucesso desta técnica está na dependência da quantidade e qualidade de oócitos que são obtidos pela técnica de aspiração folicular orientado por ultra-sonografia (OPU).

Buratini et al. (1999) observaram aumento do número de folículos menores que 3 mm, acompanhado de elevação das concentrações plasmáticas do hormônio do crescimento e do fator de crescimento semelhante a insulina (IGFI) sugerindo que a associação de aspiração folicular e do tratamento com a BST podem ser utilizados, com êxito em protocolos superovulatórios de bovinos. Com base nestes dados, a hipótese é que o BST poderá melhorar a quantidade e qualidade dos oócitos, e conseqüentemente, dos embriões produzidos *in vitro* contribuindo para os trabalhos de produção e melhoramento genético animal.

<sup>1</sup> Discente do curso de Medicina Veterinária do Cesumar. Departamento de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do PROBIC – Cesumar. [thiagoserrilho@hotmail.com](mailto:thiagoserrilho@hotmail.com).

<sup>2</sup> Pesquisador do curso de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá.

<sup>3</sup> Docentes do CESUMAR. Departamento de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. [fbim52@hotmail.com](mailto:fbim52@hotmail.com).

Vários estudos tem comprovado tendência de melhora de qualidade do oócitos nos animais tratados com rBST (PAVLOK et al., 1996). O BST age em nível de ovário, aumentando o número de folículos recrutados com diâmetros entre 2 e 5 mm, estimulando o crescimento e o desenvolvimento folicular e controlando a função do corpo lúteo (LUCY et al., 1993). O mecanismo de ação do rBST é mediado pela elevação das concentrações intrafoliculares de IGF-I que estimula a proliferação e a esteroidogênese pelas células da granulosa, além de prevenir ou retardar o processo de atresia folicular (MONDSCHHEIN et al., 1989).

Desta forma, objetivou-se com este trabalho, avaliar a administração de rBST sobre a qualidade e a quantidade de oócitos obtidos de doadoras da raça Nelore, bem como os embriões produzidos *in vitro* a partir dos oócitos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Centro de Biotecnologia do CESUMAR – BIOTEC. Foram utilizadas 25 fêmeas, adultas, da raça Nelore, Puras de Origem (PO), com idade entre 4 e 7 anos, com peso médio de 600 Kg, submetidos a exame ginecológico completo antes de iniciar o experimento. Todos os animais foram mantidos em piquetes de gramínea coast croos, recebendo apenas sal mineralizado à vontade.

As fêmeas foram distribuídas, aleatoriamente, em dois tratamentos: 1 – 13 animais; Controle e, 2 – 12; animais administração de 500 mg de somatotropina Bovina recombinante (rBST) por via subcutânea cinco dias antes da data de aspiração (Shering - Boosting®). Para sincronizar a onda folicular das vacas foram utilizados implantes de progestágenos na face externa da orelha (Nogestomet, 3mg Crestar®) e administração intramuscular de 2,0 mg de Benzoato de Estradiol (Estrogin®), juntamente com 500 mg somatotropina bovina recombinante (BST - Boostin®) por via subcutânea, na fossa ísquio-retal no grupo tratamento e no grupo controle 2 mL de solução fisiológica por via, subcutâneo, na fossa ísquio-retal, como placebo.

A colheita dos oócitos foi realizada cinco dias após a aplicação do rBST. Os animais receberam uma anestesia epidural antes da aspiração. Os oócitos foram obtidos através da aspiração folicular com ultra-som Aloka 500®, equipado com transdutor setorial intravaginal de cinco MHz e dispositivo com agulha WTA® 20G para punção folicular, conectado a uma bomba de vácuo (Cook®), com pressão de 40 a 50 mm de Hg.

Os oócitos foram aspirados em uma solução contendo 2,0 % de soro fetal bovino (Nutricell), 25 UI/ml de heparina sódica (Liquemine) e 98,0 % de PBS (Nutricell), evitando a coagulação sanguínea no interior do sistema de aspiração. O material aspirado foi imediatamente transferido para o filtro de colheita de embriões e lavado com a mesma solução utilizada durante a aspiração. O sedimento restante no filtro foi observado em placas de Petri e efetuado a busca e contagem dos oócitos com posterior classificação da qualidade. Os oócitos foram classificados em graus I, II e III, desnudo, expandidos, degenerados e atrésicos. Os oócitos considerados viáveis foram classificados como I, II e III, lavados em solução comercial MIV-T (Nutricell) e transportados em criotubos (Corning®), para o laboratório, contendo meio de maturação em banho Maria a 35 °C.

A maturação foi realizada em TCM199 (nutricell) com sais de Earles, glutamina e NaHCO<sub>3</sub>, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 22 µg/mL piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg de FSH/mL, 50 µg de LH/mL e 1 µg de estradiol/mL, mantidos em estufa, a 39 °C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar com máxima umidade, durante 22 a 24 horas. Os oócitos foram colocados em microgotas de 90 µL de meio de maturação, coberta por óleo mineral.

A fecundação foi realizada em 100 µL de meio TALP suplementado com 10 µg/mL de heparina, 22 µL/mL de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, albumina sérica bovina-BSA (sem ácidos graxos), solução de PHE (2 µM de penicilina, 1 µM de hipotaurina e 0,25 µM

de epinefrina). O sêmen foi touro Nelore, descongelado em banho-maria a 35 °C, que foi submetido a centrifugação em gradiente percoll (90 e 45%), durante 20 minutos. Utilizou-se 1x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, e os oócitos foram transferidos para as microgotas (20 oócitos/gota), onde permaneceram por 15 a 18 horas, a 39°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

Após a fertilização, os zigotos foram cultivados *in vitro*, no meio SOF suplementado com SFB, com monocamada de células da granulosa, por 15 horas, em incubadora, com atmosfera gasosa contendo 20% CO<sub>2</sub>, em ar, com máxima umidade. Decorridas 48 horas, avaliou-se a taxa de clivagem e realizou-se a renovação do meio de cultivo.

O delineamento experimental foi um sistema de Cross-Over, inteiramente casualizado, em que os tratamentos iniciais, após trinta dias sem receber os tratamentos, foram invertidos. Os dados foram submetidos à análise da variância, sendo considerados os efeitos dos tratamentos (com e sem rBST) com 12 e 13 repetições e para a comparação das médias foi utilizado o teste de F.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar na tabela 1 que não houve efeito ( $p > 0,05$ ) da aplicação da Somatotropina Recombinante Bovina (rBST) na quantidade de oócitos de nível I, II, III, desnudo, degenerado e no número de oócitos totais em vacas da raça Nelore ( $P > 0,07$ ). Ramos et al. (2007) também não encontrou efeito da aplicação de rBST no número e qualidade dos oócitos aspirados, apesar de Buratini et al. (1999) ter observado um aumento no número de folículos recrutados e este aumento parece ser mediado pelo aumento das concentrações de IGF-I e insulina, tais hormônios podem atuar juntos na proliferação e esteroidogênese em cultivos de células da granulosa de bovinos.

Em relação a qualidade dos oócitos, também não houve efeito ( $P > 0,05$ ) da aplicação de rBST no número de oócitos de nível I, II e III (Tabela 1) pois não aumentou a porcentagem de oócitos viáveis, classificados como grau I, II e III. Por outro lado, Tripp et al. (2000) evidenciou melhora na qualidade dos oócitos ao utilizarem rBST antes da aspiração folicular.

Tabela 1. Efeito da aplicação de 500mg de rBST cinco dias antes da aspiração no número e qualidade de oócitos viáveis em vacas da raça Nelore.

Classificação de oócitos	Controle	rBST <sup>6</sup>	EPM <sup>7</sup>
Oócitos nível I <sup>1</sup>	5,28	5,40	0,9508
Oócitos nível II <sup>2</sup>	2,16	2,84	0,4853
Oócitos nível III <sup>3</sup>	6,36	6,64	1,3321
Oócitos desnudo <sup>4</sup>	0,48	1,08	0,4282
oócitos expandidos <sup>5</sup>	0,92	1,60	0,3672
Oócitos totais viáveis	15,20	17,56	2,5807

<sup>1</sup>( $P < 0,07$ ).

<sup>1</sup> Nível 1: Cumulus compacto presente, contendo mais de três camadas de células

<sup>2</sup> Nível 2: Cumulus parcialmente compacto, contendo menos de 3 camadas de células

<sup>3</sup>Nível 3:

<sup>4</sup>Desnudo: sem a presença de cumulus

<sup>5</sup>Expandido: cumulus presente mais expandido

<sup>6</sup> rBST: Somatotropina Recombinante Bovina

<sup>7</sup>EPM: Erro padrão da Média

Pode-se verificar na Tabela 2 que os animais ao receberem 500mg de rBST cinco dias antes da aspiração folicular apresentaram um aumento ( $p < 0,07$ ) no número de blastocistos iniciais e no número de embriões totais. No entanto, a aplicação de rBST, em vacas da raça Nelore não alterou o número de blastocistos, blastocistos expandidos e blastocistos eclodidos.

Ramos et al (2007), trabalhando com vacas da raça Gir, relataram que a aplicação de 160 mg de rBST quatro dias antes da aspiração folicular aumentou a taxa de clivagem e a produção de embriões. De acordo com o autor este aumento pode estar relacionado à influência direta ou indireta no microambiente folicular e ou no próprio oócito.

Tabela 2. Efeito da Aplicação de rBST cinco dias antes da aspiração na produção de embrião produzidos in vitro em vacas da raça Nelore

	Controle	rBST <sup>2</sup>	EPM <sup>3</sup>
Número de animais	25	25	
Número de blastocisto inicial	0,24a	1,44b	0,3249
Número de blastocistos	1,28	1,64	0,3038
Número de blastocistos expandidos	1,28	1,76	0,4878
Número de blastocistos eclodidos	0,00	0,08	0,0565
Total de embriões viáveis	2,80a	4,84b	0,7699
Taxa de embriões viáveis (%) <sup>1</sup>	18,40	27,60	0,0583

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de mesma letra na mesma linha diferem entre si estatisticamente ( $P < 0,07$ ).

<sup>1</sup> Número de embriões viáveis em relação a quantidade de oócitos viáveis.

<sup>2</sup> rBST: Somatotropina Recombinante Bovina

<sup>3</sup>EPM: Erro padrão da Média

Mesmo não tendo diferença entre a quantidade de oócitos, na taxa de Blastocisto, a quantidade de embriões viáveis foi maior no tratamento com rBST, devido as aspiração de maiores quantidade de oócitos viáveis.

## CONCLUSÃO

O tratamento com 500 mg de rBST administrado cinco dias antes da aspiração folicular não alterou a quantidade e qualidade de oócitos aspirados, mas aumentou o número de blastocistos iniciais e o de embriões viáveis totais produzidos a partir de oócitos colhidos de vacas Nelore.

## REFERÊNCIAS

BURATINI JR., et al. Os efeitos do BST e da ablação do folículo dominante sobre o desenvolvimento folicular. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, vol. 27, n.1, p.147-162, 1999.

BURATINI JR., et al. Os efeitos do BST e da ablação do folículo dominante sobre o desenvolvimento folicular. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.27, n.1, p.147-162, 1999.

GONÇALVES, P.B.D., et al. Produção in vitro de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. (Eds.). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p.195-196.

LUCY, M.C., et al. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v.48, p.1219-1227, 1993.

MONDSCHHEIN, J.S., et al. Insulin-like growth factor (IGFs) as autocrine/paracrine regulators of granulosa cell differentiation and growth: studies with a neutralizing monoclonal antibody to IGF-I. **Biology of Reproduction**, v.40. p.79-85, 1989.

PAVLOK, A., et al. Effect of recombinant bovine somatotropina of follicular growth and quality of oocytes in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.41, n.3-4, p. 183 – 921, 1996.

RAMOS. A.A., et al. Efeito da somatotropina na população folicular, recuperação de oócitos e produção in vitro de embriões em vacas Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p. 380-386, 2007.

TRIPP, M.W., et al. Influence of somatotropin and nutrition on bovine oocyte retrieval and in vitro development.. **Theriogenology**, v.53, n8,p.1581-1590, 2000.