

## OBTENÇÃO DE OÓCITOS E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO* DE VACAS NELORE SUPERESTIMULADAS COM FSH E eCG

**Lisiane Zaniboni<sup>1</sup>; Bianca Gregório de Souza<sup>1</sup>; Antonio Hugo Bezerra Colombo<sup>1</sup>;  
Luiz Paulo Rigolon<sup>2</sup>, Fábio Luiz Bim Cavaleri<sup>2</sup>**

**RESUMO:** Avaliou-se a produção de oócitos e embriões produzidos *in vitro* de 42 vacas, mestiça Nelore (*Bos taurus indicus*) proveniente do mesmo grupo genético, com idade entre 4 a 9 anos, com peso médio de 420 Kg, superestimuladas com FSH e eCG. Estas foram distribuídas em três grupos: Grupo 1 = Controle (n=14), apenas OPU, Grupo 2 = tratadas com 1400 UI eCG, em dose única + OPU (n=14) e Grupo 3 = tratadas com 120 UI de FSH, administrados com intervalo de 12 horas em quatro doses + OPU (n=14). Os animais passaram por um período de adaptação de 15 dias, recebendo silagem de milho e concentrado. Todos os grupos receberam implante auricular contendo 3 mg de Norgestomet no primeiro dia (D0) associado a administração de 2 mg de benzoato de estradiol via intramuscular. No sétimo dia (D7) foram retirados todos os implantes e na seqüência foram realizadas as aspirações ovarianas das vacas do grupo 1 (OPU). O grupo 2 recebeu a aplicação de eCG no quinto dia e a OPU foi realizada no D7. Já o grupo 3 recebeu o tratamento com FSH no quinto e sexto dia, e foram aspiradas (OPU) em D7. O procedimento de aspiração folicular foi realizado via transvaginal guiada por ultrassom. Foram realizadas 42 aspirações com obtenção de 627 oócitos, sendo 502 viáveis e 125 inviáveis. A seguir realizou-se a maturação e fecundação *in vitro*. Avaliaram-se as taxas de clivagem, blastocisto e eclosão. Não houve diferenças significativas (p>0,05) nos parâmetros avaliados entre os grupos. Conclui-se que o estímulo gonadotrófico com FSH e com eCG nas doses utilizadas, foram insuficientes para incrementar a qualidade de oócitos viáveis submetidos a fertilização *in vitro* para produção de embriões.

**PALAVRA CHAVE:** eCG, embrião, FSH, Mestiça Nelore

### INTRODUÇÃO

A utilização de fármacos na reprodução assistida sofreu significativos progressos na última década, de modo que, atualmente, alguns ainda vêm sendo intensamente testados e diversos outros já são empregados rotineiramente com grande sucesso. Utilizando-se a hormonioterapia é possível incrementar os índices reprodutivos dos rebanhos de corte e de leite, tanto para o tratamento individual (afecções ovarianas), quanto para tratamento de rebanhos (programas de inseminação artificial, superestimulação ovariana em animais de elevado valor) (Kozicki et al., 2005).

A biotecnologia reprodutiva tem sido utilizada para possibilitar a multiplicação acelerada e aprimoramento da genética de um rebanho, assim como para aumentar a difusão de animais com alto valor zootécnico e comercial. O sucesso destas tecnologias como a transferência de embriões (TE) e a fertilização *in vitro* dependem, em grande parte, da resposta à superovulação. Nos atuais programas comerciais de TE, a resposta

<sup>1</sup> Acadêmicos do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. Maringá – Paraná. Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq-Cesumar). [lisinha\\_boni@hotmail.com](mailto:lisinha_boni@hotmail.com), [biancagregorio@hotmail.com](mailto:biancagregorio@hotmail.com), [colombobhantonio@gmail.com](mailto:colombobhantonio@gmail.com)

<sup>2</sup> Orientadores, docentes do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR. [rigolon@wnet.com.br](mailto:rigolon@wnet.com.br); [fbim52@hotmail.com](mailto:fbim52@hotmail.com)

de doadoras submetidas a superovulação se caracteriza por uma alta variação nas taxas de ovulação e fecundação, o que leva a resultados não tão previsíveis e nem confiáveis na produção de embriões (Boland et al., 1991). A variabilidade na produção de embriões pode ser influenciada por fatores relacionados com o tratamento superovulatório, em maior grau por fatores individuais associados às características da dinâmica folicular ovariana (Bó et al., 1995; Bó et al., 2000) ou a condição ovariana no momento da superovulação (Monniaux et al., 1983). Técnicas como maturação, fecundação e cultivo *in vitro* estão sendo utilizadas com o intuito de aumentar o uso de oócitos presentes nos ovários dos animais potencialmente doadores.

Entre as técnicas utilizadas para a coleta de oócitos, a aspiração transvaginal guiada por ultrassom é a que apresenta maior número de embriões produzidos *in vitro* por doadoras devido a sua alta repetibilidade, possibilitando um maior número de oócitos recuperados (Pieterse et al., 1988).

Nos últimos anos muitos grupos de pesquisa vêm trabalhando com o intuito de aprimorar a maturação citoplasmática *in vitro* e conseqüentemente melhorar a capacidade de desenvolvimento embrionário de oócitos provenientes de folículos antrais pequenos. Estudos da regulação da maturação de oócito são essenciais para a geração de conhecimentos necessários para o aumento dos índices de produção de embriões *in vitro*.

O objetivo do presente trabalho foi avaliação de oócitos de doadoras mestiças Nelore (*Bos indicus*), verificando o efeito do tratamento estimulatório com FSH e eCG sobre a taxa de recuperação, a produção e a qualidade morfológica de oócitos colhidos por punção folicular por via transvaginal, orientada pela ultrassonografia, e subsequente produção *in vitro* (PIV) dos embriões.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Centro de Biotecnologia da Reprodução – BIOTEC, na Fazenda CESUMAR (Centro de Ensino Superior de Maringá) localizada no município de Maringá – PR. Utilizou-se 42 fêmeas adultas mestiças Nelore (*Bos indicus*) proveniente do mesmo grupo genético, com idade entre 4 a 9 anos, com peso médio de 420 Kg. Estas fêmeas foram everminadas com Ivermectina 1% (Ivomec, Merial®), e passaram por um período de adaptação de 45 dias, onde permaneceram em pastagem de *Cynodon* spp. (grama estrela) e tiveram acesso à água e sal mineral *Ad libitum*.

Após esse período elas foram separadas aleatoriamente em três grupos de 14 animais: Grupo 1: (apenas OPU), Grupo 2: (superestimulação com eCG seguida de OPU), Grupo 3: (superestimulação com FSH seguida de OPU). Todos os grupos receberam implante auricular contendo 3 mg de Norgestomet no dia 0 (D0) (Crestar, Intervet, Bosmeer, Holanda) associado a administração de 2 mg de benzoato de estradiol (BE), (Cronibest, Biogenesis, Bagó, Curitiba, Paraná) via intramuscular. Os implantes foram retirados em sete dias de todos os animais e em seguida foi realizada 1 aspiração folicular via ultrason em cada animal de cada grupo, totalizando 42 OPUs.

Os oócitos foram quantificados e classificados de acordo com sua morfologia; em qualidade 1, 2 e 3; oócitos sem *cumulus* ou desnudos; expandidos, degenerados e atresicos; conforme descrito por Gonçalves et al. (2001). Então sofrem a maturação e fertilização e após 7 dias avaliou-se os embriões de cada grupo.

Os dados foram analisados no software SAS Versão 8. A diferença entre os grupos no número de oócitos viáveis, inviáveis, clivados, embriões e embriões eclodidos foram analisados por análise de variância (PROC GLM) e as diferenças entre médias pelo teste Tukey.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que não houve efeito ( $p > 0,05$ ), nos tratamentos com eCG e FSH no número de oócitos viáveis com relação ao grupo controle. O fato de não haver diferença significativa entre as quantidades de oócitos morfológicamente viáveis (tabela 1), pode indicar que a sincronização da onda folicular permitiu que todos os ovócitos estivessem na mesma fase fisiológica, não havendo diferença entre os estimulados ou não.

Tabela 1. Efeito da aplicação do eCG (gonadotrofina coriônica eqüina) e ou do FSH (hormônio folículo estimulante) sob a qualidade dos oócitos viáveis de vacas.

Produção de oócitos viáveis	Tratamentos <sup>1</sup>		
	Controle	eCG	FSH
Oócitos viáveis	10,50 ± 11,56	16,38 ± 15,21	10,35 ± 7,27
Qualidade 1	2,00 ± 3,96	5,46 ± 9,00	3,00 ± 3,74
Qualidade 2	1,07 ± 1,59	2,00 ± 4,16	2,07 ± 2,05
Qualidade 3	5,71 ± 8,58	5,15 ± 4,91	2,00 ± 2,07
Expandidos	1,71 ± 2,26	3,77 ± 3,58	3,07 ± 4,68

<sup>1</sup> Valores não significativos pelo teste de Tukey a 5%.

Os tratamentos superovulatórios disponíveis no mercado apresentam resultados com grande variação. Essa variedade de respostas tem origens múltiplas e ainda pouco compreendidas, mas parece estar relacionadas a fatores como aspectos genéticos (raças), fisiológicos (idade, condição ovariana), nutricionais, sanitários ou patológicos. Isso torna impossível a previsão de número de embriões que serão recuperados de cada animal. A gonadotrofina coriônica equina (eCG) apresenta um custo mais baixo e pode ser facilmente encontrada, além de exigir aplicação em dose única, o que facilita o manejo dos animais. Já o FSH (hormônio folículo estimulante - extrato parcialmente purificado de hipófise de origem suína, ovina ou eqüina) trata-se um produto de custo elevado e, devido à sua meia-vida curta, requer aplicação de doses múltiplas.

Neste trabalho utilizou-se a pré-estimulação com FSH e eCG, após sincronização das ondas foliculares com implante auricular de Norgestomet e aplicação intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol com intuito de minimizar o efeito de algum folículo dominante (Bó et al., 1995), que resultou em uma média de oócitos viáveis de 10,35 ± 7,27 com FSH, sendo esta média de 16,38 ± 15,21, com eCG e de 10,50 ± 11,56 no grupo controle. A diferença nos resultados encontrados neste trabalho não foi significativa ( $p > 0,05$ ).

Com relação às taxas de clivagem, blastocisto e eclosão (Tabela 6), a pré-estimulação com FSH resultou em de 63,35%, 38, 57% e 24,58% respectivamente. Já a pré-estimulação com eCG resultou em uma taxa de clivagem, blastocisto e eclosão de 72,73%, 36,46% e 27,92% respectivamente. Em comparação com o grupo controle que teve a taxa de clivagem, blastocisto e eclosão de 72,57%, 37,50% e 28,07% respectivamente.

No presente trabalho o número de oócitos viáveis recuperados por punção apresentou uma variação muito grande entre os animais, tanto no Grupo Controle (1 a 43), Grupo 3 - FSH (2 a 27) e Grupo 2 - eCG (2 a 49), o que evidencia apenas diferenças no potencial de vacas utilizadas como doadoras de oócitos.

## CONCLUSÃO

O estímulo gonadotrófico com FSH na dosagem de 120 UI em quatro doses por animal e com eCG na dosagem de 1400 UI em dose única por animal, foram insuficiente para incrementar o número de oócitos viáveis na técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom.

A superestimulação ovariana com FSH na dosagem de 120 UI em quatro doses por animal e com eCG em dose única de 1400 UI por animal, foram insuficiente para incrementar a produção *in vitro* de embriões da raça mestiço nelore.

Conclui-se que pesquisas de ordem técnica e biológica poderiam contribuir para o incremento da OPU, aumentando a eficiência do procedimento e disponibilizando mais ovócitos para os procedimentos de produção *in vitro* de embriões. Precisando de mais estudos sobre o assunto.

## REFERENCIAS

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; et al. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 139-204, 1995.

BÓ, G. A., ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J. Dinâmica folicular ovárica em EI bovino. In MADUREIRA, E.H BARUSELLI, P.S **Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**, São Paulo, FUNVET, p.12-34. 2000.

BOLAND, M. P.; GOULDING, D.; ROCHE, J. F. Alternatives gonadotrophins for superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 35, p. 5-17, 1991.

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de Embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda. p. 195-226, 2001.

KOZICKI, L.E.; SEGUI, M.S.; FANTINI FILHO, J.C.; PRADO, F.R.A; MATTÉ, F.; GLASER JR., P.; WEISS, R.R. A somatotrofina bovina (bst) e sua relação com o recrutamento folicular ovariano durante o ciclo estral de vacas. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.1, p.35-44, 2005.

MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory response of cattle. **Theriogenology**, v. 19, p. 55 – 81, 1983.

PIETERSE, M. C.; KAPPEN, K. A.; KRUIP, A. M.; TAVERNE, M. A. M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning ovaries. **Theriogenology**, v. 30, p. 751-756, 1988.