

PRODUÇÃO DE EMBRIÕES OVINOS EM LABORATÓRIO A PARTIR DE DOADORAS JUVENIS DA RAÇA SANTA INÊS SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO OVARIANA

João Flávio Panattoni Martins¹; Thainá de Oliveira Santos²; Marcos Donizete da Silva²; Bruna Nanzer Souza²; Priscila Carvalho de Oliveira¹; Cristiane Leite Figueiredo³; Aduino de Carvalho Rosas Filho¹; Rogério Navarro de Abreu¹

¹ Docentes do Curso de Medicina Veterinária - UNIFEOB - São João da Boa Vista – SP CEP 13874-159 joaoflavio@unifeob.edu.br

² Alunos do Curso de Medicina - UNIFEOB - São João da Boa Vista – SP

³ Médica Veterinária Autônoma.

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo verificar a resposta superovulatória de fêmeas ovinas juvenis da raça Santa Inês e avaliar a viabilidade dos oócitos obtidos para produção *in vitro* (PIV) de embriões. Foram selecionadas 08 fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas, distribuídas em 2 grupos homogêneos de 04 animais. As fêmeas do Grupo 1 (G1) foram submetidas à estimulação ovariana exógena e o Grupo 2 (G2) as fêmeas foram aspiradas livres de tratamento hormonal. De um total de 309 oócitos recuperados (G1=187 e G2=122), foram obtidos índices de clivagem de 49,2% e 40,2% para G1 (n=92) e G2 (n=45) respectivamente, e de 18,72% e 17,96% de desenvolvimento de embriões viáveis no D7 (G1=35 e G2=19). Embora os resultados sugiram uma melhor eficiência na recuperação de oócitos e taxa de clivagem no G1, os índices de obtenção de embriões viáveis no D7 não diferiram numericamente entre os dois grupos. Nossos resultados sugerem que, embora tenha havido grande variação da quantidade de oócitos obtidos e da produção de embriões entre os animais, independentemente do tratamento, a produção de embriões por fecundação *in vitro* (FIV) a partir de fêmeas juvenis tratadas ou não com hormônios exógenos demonstrou-se viável, inclusive com boa eficiência do protocolo hormonal utilizado para fêmeas da raça Santa Inês.

PALAVRAS-CHAVE: embriões, fecundação *in vitro*, oócitos, ovinos, Santa Inês

INTRODUÇÃO

O Brasil dispõe de um rebanho ovino em franca ascensão embora não tenha atingido 20 milhões de animais, sendo que a demanda por carne ovina vem crescendo no mercado interno e projeções revelam a possibilidade do país se tornar importante exportador no setor. Com o respaldo destas previsões a ovinocultura vem se expandindo por todo território nacional e na região Sudeste a adesão dos produtores é crescente, firmando-se como alternativa promissora de produção animal. Alguns poucos estudos científicos envolvendo as raças brasileiras: Somalis Brasileiro, Morada Nova e Santa Inês, comprovam que a raça Santa Inês contempla cordeiros com melhores índices de peso ao nascimento e maior rapidez em ganho de peso (FIGUEIREDO *et al.*, 1982; RAJAB *et al.*, 1992), difundindo-se como animal ideal para a produção de carne e couro adaptado às condições tropicais e tornando-se a base do plantel nacional, sendo comum entre os criadores brasileiros a apologia à raça como o “Nelore da ovinocultura”. Contudo, não se pode deixar de considerar a notória necessidade da implantação de um programa de melhoramento genético conduzido por critérios científicos a exemplo do que vem ocorrendo em várias raças em países desenvolvidos.

Em favor deste processo, o cenário que se dispõe no campo da biotecnologia da reprodução animal é de rápida progressão, principalmente das tecnologias “*in vitro*”, que demonstram a tendência de forte evolução dos sistemas de produção animal.

Os procedimentos de aspiração folicular, maturação e fertilização *in vitro* de oócitos, viabilizaram a exploração do potencial reprodutivo das fêmeas de maneira revolucionária, oferecendo a possibilidade de aceleração do ganho genético através da redução do intervalo entre gerações e a maximização do número de nascimentos a partir de fêmeas de alto valor genético (LOHUIS *et al.*, 1995), principalmente, quando doadoras juvenis são utilizadas (EARL *et al.*, 1995; BALDASSARRE *et al.*, 1996), além de protocolos de estimulação ovariana

(BERLINGUER *et al.*, 2003; COGNIÉ *et al.*, 2004) e as técnicas de criopreservação (MARTINEZ *et al.*, 1998).

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 08 fêmeas da raça Santa Inês com idade de 6 a 7 semanas, distribuídas em 02 grupos homogêneos de 04 animais. As fêmeas do Grupo 1 (G1) foram submetidas à estimulação ovariana utilizando-se 4 doses constantes de 40mg de hormônio folículo estimulante (FSH) em intervalos de 12 horas, administrando-se 500UI de eCG adicionais à última dose de FSH, e a aspiração foi realizada 12 horas após o tratamento. O Grupo 2 (G2) foi mantido como controle, sendo que as fêmeas foram aspiradas livres de tratamento hormonal. O procedimento de aspiração folicular foi realizado por laparotomia, posicionando-se as doadoras em decúbito dorsal em maca inclinada 60°, com a cabeça voltada para o lado inferior, utilizando-se atropina (0,02 mg/Kg) como medicação pré-anestésica, associação anestésica de xilazina (0,1 mg/Kg) e quetamina (5 mg/Kg) e cloridrato de lidocaína no local da incisão. Foi realizada uma incisão na linha alba de aproximadamente 5 centímetros através da qual se realizou a exposição ovariana para aspiração. Durante o procedimento de aspiração, os ovários expostos e eventualmente porções uterinas, foram constantemente umedecidos com solução fisiológica e lavados ao término da aspiração, com a solução soro fisiológico (500 mL), Dimetilsulfóxido (DMSO) (5 mL) e Heparina (1 mL) no intuito de se prevenir possíveis aderências. Os folículos ovarianos foram aspirados com agulha 25x7 acoplada a uma bomba de vácuo calibrada em 40 mmHg, através de um sistema de aspiração e os oócitos coletados em um tubo Falcon de 50 mL contendo 10 mL de meio para cultivo celular TCM199, suplementado com 10% de soro fetal bovino, heparina (0,05 mg/mL) e sulfato de gentamicina (0,05mg/mL), mantidos a 39° C em banho-maria. Após cada procedimento os ovários foram lavados com solução fisiológica. Os oócitos recuperados foram lavados 3 vezes em meio TCM199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, transferidos para gotas de 90µL de meio de maturação TCM199, enriquecido com 10% de soro inativado de ovelha em estro, FSH (5µg/mL), Hormônio Luteinizante (LH) (5 µg/mL), estradiol (1 µg/mL), piruvato de sódio (0,3 mM) e Cisteamina (100 µM), cobertas com óleo mineral em placas de 50mm e incubados a 39° C com 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂ e máxima umidade durante 24 à 26hs. Após maturação os oócitos foram parcialmente desnudos das células do cúmulus através da pipetagem. Para fecundação foi utilizado sêmen congelado comercial do carneiro da raça Santa Inês Tingui 655, sendo que as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 39° C e submetidas a centrifugação à 2500 rotações por minuto em gradiente de percol por 30 minutos. Os espermatozoides coletados foram diluídos na concentração de 1 x 10⁶ espermatozoides/mL e incubados por 1 hora para capacitação em meio enriquecido com 20% de soro inativado de estro de ovelha, piruvato (22 µg/ml) e solução de 2 µM de penicilamina, 1 µM de hipotaurina e 0,25 µM de epinefrina) e isoproterenol (16 µM). Os oócitos maturados foram lavados 3 vezes em meio pré FIV e 3 vezes em meio FIV. O processo de fecundação ocorreu em gotas de 100 µL de meio FIV ovinos, com 1x10⁶ espermatozoides/mL e aproximadamente 20 oócitos por gota, durante 18 à 20 horas a 39° C com 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂ e máxima umidade. Os supostos zigotos foram cultivados em gotas de 50µL de meio de cultura SOF enriquecido com 2% de aminoácidos essenciais, 1% de aminoácidos não essenciais, 1 mM de glutamina e 10% de soro de ovelha em cio. Decorridas 18 a 20 horas pós-inseminação (D0), foi avaliada a taxa de clivagem, a renovação do meio de cultivo e o cultivo até D7, para avaliar a competência de desenvolvimento e a taxa de embriões.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um total de 309 oócitos recuperados (G1=187 e G2=122), foram obtidos índices de clivagem de 49,2% e 40,2% para G1 (n=92) e G2 (n=45) respectivamente, e de 18,72% e 17,96% de desenvolvimento de embriões viáveis no D7 (G1=35 e G2=19). Embora os resultados mostrem uma melhor eficiência na recuperação de oócitos e taxa de clivagem no G1, os índices de obtenção de embriões viáveis no D7 não diferiram numericamente entre os dois grupos. Entretanto, a avaliação individual dos animais revelou grande variabilidade da condição ovariana em ambos os grupos com destaque para uma fêmea do grupo tratado (G1), da qual recuperou-se 78 oócitos, e para uma fêmea do G2, livre de tratamento hormonal, que

proporcionou a recuperação de 50 oócitos. Por outro lado, obteve-se 26 oócitos e 02 embriões de um dos animais do grupo G1 e 06 oócitos e nenhum embrião de outro animal no grupo controle (G2). Embora bem estabelecidas na espécie bovina, pesquisas demonstram que a utilização de técnicas superovulatórias em fêmeas ovinas apresenta grande variabilidade de resposta e resultados controversos são comumente encontrados na literatura, atribuídos principalmente a raça e idade das doadoras (MARIANA *et al.*, 1998; ABDENNEBI, 1999; GALLI, *et al.*, 2001). Baldassarre em 1996, realizando aspiração folicular em ovelhas 24 horas após o tratamento com gonadotrofinas, obtiveram média de 1,1 blastocistos por doadora a partir de 06 oócitos selecionados em média para maturação e FIV. No mesmo ano e utilizando o mesmo procedimento, Tervit e colaboradores, embora tenham registrado alto grau de variação entre as doadoras, reportaram a obtenção de 2 a 3 blastocistos de boa qualidade que resultaram média de 1,5 cordeiros nascidos por ovelha; resultados estes, confirmados em 1999 pelo grupo do pesquisador Ptak.

A aspiração folicular realizada após tratamento com dose única de 1500 UI de gonadotrofina coriônica eqüina (ECG), proporcionou menor número de oócitos comparado com fêmeas não tratadas, além de não haver diferenças na qualidade dos complexos de oócitos e células granulosas obtidos (STANGL *et al.*, 1999). Resultados semelhantes foram publicados, comparando a qualidade dos oócitos coletados de ovários de matadouro provenientes de ovelhas tratadas com eCG e ovelhas não submetidas a estimulação (SEVILLANO *et al.*, 1997). Dentre os protocolos disponíveis de estimulação ovariana em ovelhas, merece destaque a associação de FSH (80 UI de Folltropin-V®) e eCG (300 UI), administrados em dose única 36 horas antes da aspiração folicular, o qual vem sendo utilizado há 4 anos pelo grupo do pesquisador Baldassarre, que realizaram 1580 procedimentos de aspiração folicular por laparoscopia, recuperando em média 13,4 oócitos por doadora (BALDASSARRE *et al.*, 2004). A associação de FSH e eCG também foi utilizada no tratamento superovulatório de fêmeas ovinas juvenis com 5 a 9 semanas de idade, resultando na aspiração de um alto número de oócitos, que submetidos a cultura e fertilização *in vitro*, resultaram taxa de clivagem de 19%, frente a 65% de blastocistos obtidos a partir de oócitos aspirados de fêmeas adultas (LEDDA *et al.*, 1999). Na espécie bovina, embora se constate resultados concordantes com o baixo rendimento na obtenção de embriões em laboratório a partir de doadoras juvenis (REVEL *et al.*, 1995; DUBY *et al.*, 1997), relatos de rendimentos melhores (ARMSTRONG *et al.*, 1992) ou iguais (ARMSTRONG *et al.*, 1994) aos obtidos utilizando-se doadoras adultas, demonstram a potencialidade de produção de embriões *in vitro* a partir de fêmeas pré-púberes.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que, embora tenha havido grande variação da quantidade de oócitos obtidos e da produção de embriões entre os animais, independentemente do tratamento, a produção de embriões por FIV a partir de fêmeas juvenis demonstrou-se viável, inclusive com boa eficiência do protocolo hormonal utilizado para fêmeas da raça Santa Inês. Considerando o volume de oócitos e embriões obtidos, esta prática revela-se de grande potencial não só para a drástica redução no intervalo entre gerações e para a exploração do potencial reprodutivo de fêmeas de alto valor genético, como também, uma alternativa ao desenvolvimento e avaliação de protocolos laboratoriais mais eficientes.

REFERÊNCIAS

- ABDENNEBI, L.; MONGET, P.; MONNIAUX, D. Comparative expression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in ovarian follicles from high and low prolific sheep breeds. **Biol Reprod**; v. 60(4), p. 845-854, 1999.
- ARMSTRONG, D.T.; HOLM, P.; SEAMARK, R.F. Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. **Theriogenology**; v. 38, p.667-678, 1992.
- ARMSTRONG, D; IRVINE, SEAMARK, R. Gonadotrophin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. **Theriogenology**; v. 42, p. 1227-1236, 1994.

- BALDASSARRE, H.; FURNUS, C.C.; DEMATOS, D.G.; PESSI, H. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocytes donors. **Theriogenology**; v. 45, p. 707-717, 1996.
- BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C.N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Anim Reprod Sci** v. 83-82, p. 255-266, 2004.
- BERLINGUER, F.; LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; PINTUS, P.P.; ROSATI, I.; LEDDA, S. FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. **Theriogenology**; v. 61, p. 1477-1486, 2004.
- COGNIÉ, Y.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. State-of-the-art production, conservation and transfer of in vitro produced embryos in small ruminants. **Reprod Fertil and Dev**; v. 16, p. 437-445, 2004.
- DUBY, R.T.; DAMIANI, P.; LOONEY, C.R.; FISSORE, R.S.; ROB, J.M. Prepubertal calves as oocyte donors: promises and problems. **Theriogenology**; v. 45, p. 121-130, 1996.
- EARL, C.R.; IRVINE, B.J.; ARMSTRONG Ovarian stimulation protocols for oocyte collection and in vitro embryo production from 8 to 9 week old lambs. **Theriogenology**; v. 43, p. 203-208, 1995.
- FIGUEIREDO, E.A.; SIMPLICIO, A.A.; PANT, K.P. Evaluation of sheep breeds for early growth in tropical north-east Brazil. **Trop Anim Health Prod** v. 14(4), p. 219-223, 1982.
- GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, P.; TURINI, R.; DUCHI, R.; LAZZARI G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**; v. 55, p. 1341-1357, 2001.
- LEDDA, S.; LEONI, G.; NAITANA, S. Production and lambing rate of blastocysts derived from in vitro matured oocytes after gonadotropin treatment of prepubertal ewe. **J Anim Sci**, v. 77; p. 2234-2239, 1999.
- LOHUIS, M.M. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. **Theriogenology**; v. 43, p. 51-80, 1995.
- MARIANA, J.C ; FONTAINE, J.; SOLARI, A. Immunization of sheep against GnRH early in life: effects on gonadotropins, follicular growth and responsiveness of granulosa cells to FSH and IGF-I in two breeds of sheep with different prolificacy. **Domest Anim Endocrinol**; v.15(4):195-207, 1998.
- MARTÍNEZ, A.G.; MATKOVIC, M. Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification. **Theriogenology**; v. 49(5), p. 1039-1049, 1998.
- PTAK, G.; DATTENA, M.; LOI, P.; CAPPAL, P. Ovum pick up in sheep: efficiency of in vitro embryo production vitrification and birth of offspring. **Theriogenology**; v. 52, p. 1105-1114, 1999.
- RAJAB, M.H.; CARTWRIGHT, T.C.; DAHM, P.F.; FIGUEIREDO, E.A. Performance of three tropical hair sheep breeds. **J Anim Sci**; v. 70(11), p. 3351-3359, 1992.
- REVEL, MERMILLOD; HEYMAN, Y. Low developmental capacity of in vitro matured and fertilised oocytes from calves compared with that of cows. **J Reprod Fertil**; v. 103, p. 115-120, 1992.
- SEVILLANO, C.; ANEL, L.; DE LA FUENTE, J.; ALVAREZ, M.; CELORRIO, I.; DE PAZ, P. In vitro development of sheep embryos derived of repeated laparoscopic folliculoaspiration. **Theriogenology**; v. 47, p. 298-303, 1997.
- STANGL, M.; KUH HOLZER, B.; BESENFELDER, U.; BREM, G. Repeated endoscopic ovum pick up in sheep. **Theriogenology**; v. 52, p. 709-716, 1999.