

Índice de recuperação e qualidade de ovócitos de bezerras Nelore, superovuladas e não superovuladas, de dois a três meses de idade

[Recovery index and quality of oocytes from Nelore heifers two to three months old superovulated and non-superovulated]

P.F. Malard¹, M.A.S. Peixer², A. P. Marques Júnior^{3*}, R. Rumpf²

^{1,2} Embrapa-Cenargen

³ Escola de Veterinária da UFMG

Av. Antônio Carlos 6627, Campus Pampulha

30161.970 - Belo Horizonte, MG

Recebido para publicação em 3 de agosto de 2000

Recebido, após modificações, em 25 de setembro de 2001

*Autora para correspondência

E-mail: ampinho@dedalus.lcc.ufmg.br

RESUMO

Avaliaram-se o índice de recuperação e a qualidade de ovócitos aspirados de ovários de bezerras Nelore de dois a três meses de idade. Foram utilizadas 18 bezerras para aspiração folicular e colheita de ovócitos, divididas em dois grupos, controle (GC, n=9) e superovulado (GT, n=9), com a superovulação feita com 140mg de FSH três dias antes da cirurgia e 1,6mg de LH endovenoso 18 horas antes da aspiração folicular. Os ovócitos foram classificados em QI, com várias camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo, QII, com aproximadamente três camadas de células do *cumulus* e citoplasma apresentando alguma granulação, QIII, com células do *cumulus* expandidas, QIV, com poucas células do *cumulus* ou desnudos e QV, degenerados. O índice médio de ovócitos obtidos do GC foi de 24,5 ovócitos/animal e do GT de 25,22 (P>0,05). O GT apresentou maior percentual de ovócitos QIII em relação ao GC, 24,7 e 5%, respectivamente. Bezerras Nelore de dois a três meses de idade possuem potencial para serem doadoras de ovócitos sem necessidade de superovulação.

Palavras-chave: Bezerra, Nelore, ovócito

ABSTRACT

Nelore heifers two to three months of age were evaluated for the recovery index and quality of their oocytes. For follicular aspiration and oocyte harvest were constituted the groups control (CG, n=9) and treated (TG, n=9), with the superovulation done with 140mg of FSH three days before surgery and 1.6 mg of LH intravenous 18 hours before surgery. The oocytes were classified as: QI-several layers of cumulus cells and homogeneous cytoplasm, QII-more than three cumulus cells layers and cytoplasm with some granulation, QIII-expanded cumulus cells, QIV-few cumulus cells or denuded, and QV-degenerated. No difference between the average index of oocyte for CG (24.5 oocytes/animal) and TG (25.2 oocytes/animal) was found. The TG showed higher percentage of QIII oocytes (24.7) than the CG (5). It can be concluded that Nelore heifers two to three months of age are fit to be oocyte donors without superovulation.

Keywords: Heifer, Nelore, oocyte

INTRODUÇÃO

O desempenho de rebanhos bovinos está diretamente relacionado com a eficiência reprodutiva das fêmeas. À semelhança do que ocorre durante o ciclo estral, animais pré-púberes e em gestação também apresentam ondas de crescimento folicular (Knopf et al., 1989).

Em vários estudos, as tentativas de se utilizar bezerras como doadoras de embrião pelo método convencional não foram bem sucedidas, sinalizando problemas tais como baixa taxa de ovulação e baixa taxa de fecundação (Onuma et al., 1969). Além disso, os embriões recolhidos exibiam baixo potencial de desenvolvimento *in vivo* (Seidel et al., 1971) e *in vitro* (Onuma et al., 1969).

Com o surgimento de produtos e técnicas mais avançadas, aumentou a possibilidade de produção de embriões a partir de ovócitos de bezerras. A produção de hormônios mais purificados possibilita diminuir a variabilidade de respostas, enquanto que técnicas cirúrgicas, como a laparoscopia, possibilitam a aspiração de folículos maduros (Lambert et al., 1983) e imaturos (Stubblings et al., 1988). Entretanto, a utilização desses ovócitos só se tornou possível com o surgimento de biotécnicas como a maturação e a fecundação *in vitro* (Gordon et al., 1990).

Ovócitos de bezerras podem ser obtidos a partir de coletas *in vitro* em ovários de abatedouro, ou *in vivo* por ovariectomia ou por aspiração de folículos visualizados por cirurgia ou por procedimentos que utilizam a ultra-sonografia.

Uma das alternativas para tornar viável a utilização de ovócitos de bezerras é a obtenção de respostas ovarianas homogêneas e eficientes a tratamentos superovulatórios que resultem em maior número de ovócitos recuperados e de qualidade.

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a eficiência de recuperação de ovócitos e sua qualidade em bezerras Nelore de dois a três meses de idade, com e sem superovulação.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 18 bezerras da raça Nelore de 60 a 90 dias de idade, pesadas e separadas em grupo-controle (nove bezerras que não receberam gonadotrofina exógena) e grupo tratado (nove bezerras que receberam gonadotrofina exógena).

A coleta de ovócitos foi feita por intervenção cirúrgica. Foram realizadas 36 cirurgias, isto é, todas as bezerras foram submetidas a dois procedimentos cirúrgicos e participaram dos dois tratamentos. O intervalo entre as cirurgias foi, em média, de 30 dias.

A estimulação ovariana foi realizada segundo Armstrong et al. (1994), modificada. Os animais receberam implante de progestágeno (Crestar® - Intervet) sete dias antes da administração de FSH, considerado-se esse o dia zero (D0) do tratamento. Sete dias após o D0 os animais do grupo tratado receberam dose única de 140mg de FSH (Folltropin® - Vetrepharm) via subcutânea, na região peri-mamária. Aproximadamente 60 horas após a administração de FSH e 18 horas antes do procedimento cirúrgico, as bezerras receberam 1,6mg de LH (Lutropin® - Vetrepharm) por via endovenosa. O progestágeno foi retirado no momento da cirurgia.

Os procedimentos pré-cirúrgicos eram iniciados com a administração de medicação pré-anestésica com cloridrato de xilazina (Rompum - Bayer). O animal, colocado em decúbito dorsal em mesa cirúrgica móvel, recebia a aplicação de dipirona (Novalgina® - Hoechst) pela via endovenosa. Em seguida realizavam-se tricotomia na região da linha branca, entre o umbigo e as duas primeiras tetas, anestesia local com 50ml de lidocaína a 2,5% na região periférica à linha branca, assepsia do local com álcool iodado e incisão de

15cm na linha branca até a abertura do peritônio. Após esses procedimentos, a mesa era elevada verticalmente, até um ângulo aproximado de 70° em relação ao chão, para facilitar o acesso aos ovários.

Após a elevação da mesa cirúrgica tracionava-se o ovário, pela introdução da mão na cavidade abdominal, para serem realizadas as punções. Com o auxílio de uma agulha de diâmetro de 20G, acoplada a uma bomba de vácuo, punçionavam-se todos os folículos visíveis. O líquido folicular e os ovócitos eram armazenados em um tubo estéril que continha meio PBS acrescido de 10% de soro fetal bovino, 100UI de heparina e antibióticos (meio de lavagem). Logo após a punção dos folículos, o tubo estéril contendo o líquido folicular e os ovócitos era levado ao laboratório, situado ao lado da sala de cirurgia.

No laboratório os ovócitos eram classificados em: qualidade I (QI) - ovócitos com muitas camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo, qualidade II (QII) - ovócitos com aproximadamente três camadas de células do *cumulus* e citoplasma apresentando alguma granulação, qualidade III (QIII) - ovócitos com as células do *cumulus* expandidas, qualidade IV (QIV) - ovócitos com poucas células do *cumulus* ou desnudos e qualidade V (QV) - ovócitos degenerados.

Os resultados foram avaliados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, segundo Sampaio (1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao se realizar a cirurgia para recuperação ovocitária, cinco animais apresentaram um folículo maior que 5mm e os demais bem menores, o que poderia indicar dominância folicular. Esse resultado foi observado nos grupos GC e GT. A não obtenção de homogeneidade folicular em todos os animais superovulados pode ser explicada com o protocolo de superovulação utilizado. Optou-se por utilizar uma única dose de FSH, administrada no tecido subcutâneo próximo à glândula mamária, em função da grande quantidade de tecido adiposo nessa área, o que diminui a velocidade de absorção desse hormônio e, principalmente, graças ao estresse causado a cada administração hormonal nos animais da raça Nelore com manejo a pasto, o que poderia causar alteração do perfil hormonal esperado. Armstrong et al. (1994) concluíram que única dose de FSH (140mg) acompanhada de pequena dose de eCG (300 UI), administradas no mesmo momento, acarretavam desenvolvimento folicular e índice de recuperação ovocitária iguais aos obtidos nos animais que receberam múltiplas injeções de FSH (totalizando 140mg), o que torna o protocolo de única administração muito mais conveniente por ser mais prático. Taneja et al. (2000) utilizaram tratamento superovulatório com 130mg de FSH durante dois dias em doses decrescentes e também observaram grande variação da resposta ovariana entre doadoras. A possível dominância folicular observada no presente trabalho pode ter sido causada pela ineficácia do tratamento em bloquear o folículo que já havia sido recrutado. Uma alternativa que poderia ter sido utilizada para minimizar o efeito de dominância folicular seria a administração de estrógeno, concomitante com o implante de progesterona. A utilização de probe ultrasonográfica especial para o acompanhamento ultrasonográfico do desenvolvimento folicular de bezerras antes de se iniciar o tratamento, optando-se pelo início do tratamento no momento do surgimento de uma onda folicular, também seria uma alternativa. Brogliatti et al. (1997), ao utilizarem a ablação de folículos com auxílio de punção folicular em bezerras da raça Hereford de seis a sete meses de idade, observaram que animais cujo maior folículo media 7,8mm de diâmetro no momento da superovulação respondiam com menor número de folículos recrutados do que animais cujo maior folículo media 3,2mm de diâmetro, concluindo que o mecanismo de dominância folicular está presente durante a pré-puberdade em bovinos.

No presente trabalho, a taxa de recuperação de ovócitos em relação ao número de folículos aspirados no grupo-controle foi de 88%, enquanto que a do grupo-superovulado se elevou para 95%. O índice médio de ovócitos obtidos no grupo-controle foi de 24,5 ovócitos por animal enquanto que no grupo-superovulado foi de 25,2 (Tab. 1). O número de ovócitos totais obtido do grupo-controle não diferiu em relação ao do grupo-superovulado, indicando que o tratamento superovulatório não aumentou a quantidade de ovócitos recuperados, e também não diminuiu a variabilidade entre os animais. Giorgio et al. (1997) demonstraram que em animais de cinco meses de idade os dados de recuperação ovocitária em

animais superovuladas e não superovuladas não diferiram (18 ± 2 e 16 ± 2 , respectivamente), apesar de o tratamento superovulatório ter promovido aumento do número de folículos aspirados. Armstrong et al. (1994) obtiveram em 18 bezerras superovuladas com FSH e LH 142 ovócitos recuperados por aspiração folicular, o que corresponde a 7,8 ovócitos/animal. Maclellan et al. (1997), ao utilizarem bezerras da raça Brahman, obtiveram 54,1 ovócitos/animal por punção dos folículos após ovariectomia.

Tabela 1. Média do número de ovócitos recuperados de bezerras Nelore de dois a três meses de idade superovuladas e não superovuladas

Grupo	n	Média de ovócitos/bezerra
Controle	18	$24,5 \pm 93,5$
Superovulado	18	$25,2 \pm 147,8$

P>0,05

No presente trabalho foi observada grande variação do número de ovócitos obtidos por doadora. Nos GC e GT o mínimo de ovócitos/animal foi de 3 e 6, e o máximo de 118 e 153, respectivamente. Taneja et al. (2000) observaram que há resposta ovariana à superovulação em função do número de folículos antrais existentes no ovário antes da superovulação, sugerindo que doadoras de elevada resposta podem ser selecionadas com base no número de folículos antrais pré-tratamento. Isto foi observado neste trabalho, pois bezerras com grande quantidade de ovócitos no tratamento sem superovulação, quando superovuladas repetiam a mesma tendência (Fig. 1). Este resultado indica a importância de se selecionar doadoras de ovócito para um programa de fecundação *in vitro* de ovócitos de bezerras, visto que maior número de ovócitos/animal minimiza os custos dessa biotecnologia.

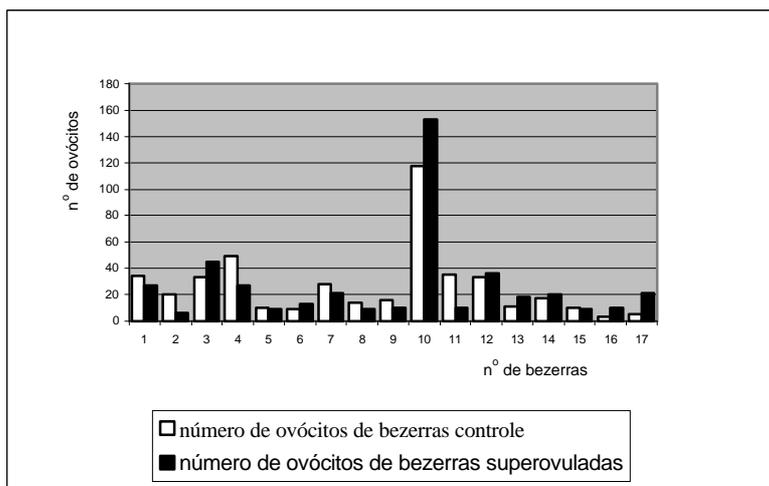


Figura 1. Variação individual no número de ovócitos aspirados de bezerras Nelore de dois a três meses de idade superovuladas e não superovuladas.

Quando se analisa a quantidade de ovócitos aspirados em relação à sua qualidade, pode-se observar que o grupo de bezerras-controle obteve a maior quantidade de ovócitos concentrada nos grupos de ovócitos qualidade II (32%) e qualidade IV (35,6%), enquanto que o número de ovócitos foi baixo para qualidade III (5%) e qualidade I (9,5%). Nas bezerras superovuladas a quantidade de ovócitos recuperados se concentrou nos grupos de ovócitos de qualidade II (33,5%), III (24,7%) e IV (32,2%). A comparação entre os dados mostrou que o índice de recuperação dos ovócitos das bezerras variou em relação à variável ovócitos qualidade III, ou seja ovócitos expandidos, no qual as bezerras superovuladas apresentaram número significativamente maior do que as bezerras-controle (Tab. 2). Maclellan et al.

Índice de recuperação e qualidade de ovócitos de bezerras Nelore...

(1998) demonstraram que bezerras que receberam FSH durante três dias consecutivos apresentaram maior concentração de ovócitos com três camadas de células compactas do *cumulus*, ou seja ovócitos qualidade II (38,3%), enquanto que ovócitos que apresentaram *cumulus* expandido representaram apenas 13,9% do total. Essa diferença pode ser atribuída à administração endovenosa de LH no protocolo de superovulação utilizado neste trabalho. A presença de LH circulante 18 horas antes da punção dos folículos pode ter promovido expansão das células do *cumulus*, o que indica início de maturação *in vivo* desses ovócitos. Armstrong et al. (1994) demonstraram que a utilização de LH, como meio de promover a maturação *in vivo* dos ovócitos, resultou em 22% de ovócitos com *cumulus* expandido. Esses autores concluíram que a administração de FSH + LH é mais eficiente por promover a expansão das células do *cumulus* de 73% dos ovócitos. A administração de FSH + eCG em única aplicação para superovular bezerras de seis a oito semanas de idade, adicionada à administração de LH para promover a maturação *in vivo* desses ovócitos, resultou em 43% de taxa de maturação ovocitária em relação ao número total de ovócitos recuperados (Earl et al., 1998).

Tabela 2. Número de ovócitos de bezerras da raça Nelore de dois a três meses de idade superovuladas e não superovuladas

Grupo	Q I	Q II	Q III	Q IV	Q V	Total
Controle	42a	141a	22a	157a	79a	441a
Superovulado	12a	152a	112b	146a	28a	454a

Valores seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05)

Q I = ovócitos de qualidade I; Q II = ovócitos de qualidade II; Q III = ovócitos de qualidade III; Q IV = ovócitos de qualidade IV; QV = ovócitos de qualidade V.

O método cirúrgico permitiu fácil acesso aos ovários, facilitando dessa forma as punções foliculares. Na segunda cirurgia, cinco dos 18 animais apresentaram tecido fibroso recobrimdo o ovário, formando uma bolsa não aderida, o que permitiu a aspiração dos folículos. Aproximadamente seis meses após as cirurgias, todos os animais tiveram o trato reprodutivo avaliado por palpação retal e ultra-sonografia. Dos 18 animais submetidos a aspiração folicular apenas um apresentou aderência entre o útero e os dois ovários. Sete animais apresentaram ecogenicidade aumentada em pelo menos um dos ovários, porém sem aderência a nenhuma estrutura. Entretanto, o possível dano causado à futura reprodução desses animais não pôde ser observado para que se pudesse certificar a eficácia da técnica. Segundo Armstrong et al. (1997), para ovários que possuem grande número de folículos após a estimulação hormonal, a laparotomia simples sob anestesia geral facilita a aspiração e melhora a taxa de recuperação ovocitária. Taneja et al. (2000) coletaram ovócitos de bezerras de dois meses de idade por meio da laparotomia e obtiveram taxas de concepção satisfatórias aos 15 meses de idade, o que levou esses autores a concluir que o método de laparotomia pode ser considerado seguro, não causando danos aos ovários ou ao trato reprodutivo.

CONCLUSÕES

A metodologia de recuperação ovocitária mostrou-se prática e de baixo custo. O índice de recuperação de ovócitos obtido torna evidente o elevado potencial de bezerras da raça Nelore de dois a três meses de idade como doadoras de ovócitos, para serem posteriormente maturados, fertilizados e cultivados *in vitro*, produzindo, dessa forma, embriões viáveis. A baixa qualidade dos ovócitos recuperados mostra a necessidade de estudos que visem estabelecer protocolos eficientes de superovulação em bezerras da raça Nelore, para melhorar a quantidade e a qualidade dos ovócitos recuperados e, conseqüentemente, sua capacidade de desenvolvimento *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTRONG, D.T., IRVINE, B.J., EARL, C.R. et al. Gonadotropin stimulation regimes for follicular aspiration and *in vitro* embryo production from calf oocytes. *Theriogenology*, v.42, p.1227-1236, 1994.
- ARMSTRONG, D.T., KOTARAS, P.J., EARL, C.R. Advances in *in vitro* embryo production from juvenile and prepuberal calf and lamb oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.9, p.333-339, 1997.
- BROGLIATTI, G.M., SALAMONE, D.F., ADAMS, G.P. Ovarian follicular waves synchronization and superstimulation in prepuberal calves. *Theriogenology*, v.47, p.1253-1264, 1997.
- EARL, C.R., FRY, R.C., MACLELLAN, L.J. et al. In vitro fertilization and developmental potential of prepubertal calf oocytes. *Gamete. Develop. Func.* LAURIA, A. et al (Ed.). Sero Symposium, Rome, 1998.
- GIORGIO, A., JIANG, S., SIMKIN, M. et al. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biol. Reprod.*, v.56, p.386-392, 1997.
- GORDON, I., LU K.H. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*, v.33, p.77-87, 1990.
- KNOPF, L., KASTELIC, J.P., SCHALLENBERGER, E. et al. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Dom. Anim. Endocrinol.*, v.6, p.111-120, 1989.
- LAMBERT, R.D., BERNARD, C., RIOUX, J.E. et al. Endoscopy in cattle by the paralumbar route technique for ovarian examination and follicular aspiration. *Theriogenology*, v.20, p.149-161, 1983.
- MACLELLAN, L.J., BERGFELD, E. G.M., EARL, C.L. et al. Influence of the luteinizing hormone-releasing hormone agonist, deslorelin, on patterns of estradiol 17 β and luteinizing hormone secretion, ovarian follicular recovery and *in vitro* development of oocytes in heifers calves. *Biol. Reprod.*, v.56, p.878-884, 1997.
- MACLELLAN, L.J., WHYTE, T.R., MURRAY, A. et al. Superstimulation of ovarian follicular growth with FSH, oocyte recovery, and embryo production from Zebu (*Bos Indicus*) calves: Effects of treatment with a GnRH agonist or antagonist. *Theriogenology*, v.49, p.1317-1329, 1998.
- ONUMA, H., FOOTE, R.H. *In vitro* development of ova from prepuberal cattle. *J. Dairy Sci.*, v.52, p.149-153, 1969.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia. Belo Horizonte, 1998. 221p.
- SEIDEL, G.E., LARSON, C.H., FOOTE, R.H. Effects of age and gonadotropin treatment on superovulation in the calf. *J. Anim. Sci.*, v.33, p.617-622, 1971.
- STUBBINGS, R.B., ARMSTRONG, D.T., BIERALT, R.A. et al. Method for aspiration bovine oocytes from small vesicular follicles. *Theriogenology*, v.35, p.312, 1988.
- TANEJA, M., BOLS, P.E.J., van der VELDE, A. et al. Developmental competence of juvenile calf oocytes *in vitro* and *in vivo*: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol. Reprod.*, v.62, p.206-213, 2000.