

EFEITO DA SOMATOTROPINA NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES EM VACAS DA RAÇA GIR1

AUTORES

ALESSANDRA A. RAMOS^{2,3}, WANDERLEI F. SÁ², ADEMIR M. FERREIRA², LUIS SÉRGIO. A. CAMARGO²,
JOÃO HENRIQUE M.VIANA², MARC R. J. M. HENRY³

¹ Órgão Financiador - FAPEMIG

² Embrapa Gado de Leite

Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco – Juiz de Fora - MG

CEP 36038-330

³ Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antônio Carlos, 6627 – Bairro Pampulha - Belo Horizonte - MG

CEP 31270-901

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da pré-estimulação ovariana com somatotropina bovina recombinante (rbST) sobre a produção in vitro de embriões de vacas da raça Gir. Utilizou-se vacas não-lactantes, em boas condições reprodutiva e corporal, cujo ciclo estral foi sincronizado pela administração de 0,5 mg de cloprostenol. Durante o experimento, as vacas receberam implantes auriculares de norgestomet, renovados a cada 14 dias. Posteriormente, os animais foram submetidos aos tratamentos: T1 (puncionados sem tratamento pré-estimulatório) e TII (receberam 160 mg de rbST em aplicação única 4 dias antes da punção). Os oócitos recuperados foram classificados e submetidos à maturação. Na fecundação in vitro utilizou-se sêmen de touro Gir, previamente capacitado. Após 22 horas de fecundação, os prováveis zigotos foram co-cultivados com células da granulosa em CR2aa acrescido de 10% de soro fetal bovino. A taxa de clivagem foi avaliada 72 horas pós-fecundação e a de blastocisto 192 horas pós-fecundação. Os dados foram analisados pelo método Qui-quadrado. O rbST (TII) aumentou ($p < 0,05$) a taxa de clivagem e produção de blastocistos ($p < 0,01$). Os resultados mostram que o uso do rbST pode melhorar a produção de embriões in vitro em animais Gir.

PALAVRAS-CHAVE

Bovinos raça, produção in vitro, raça gir, rbST

TITLE

EFFECT OF SOMATOTROPIN ON IN VITRO EMBRYO PRODUCTION IN GIR COWS

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate ovarian pre-stimulation using recombinant bovine somatotropin (rbST) on in vitro embryo production in Gir cows. Non-lactating cycling cows with good body and reproductive conditions were used. Estrous cycles were synchronized with cloprostenol. During the experiment, animals received norgestomet ear implants, replaced every fourteen days. Animals were submitted to treatments: T1 (punctured without pre-stimulation) e TII (received 160 mg of rbST four days before aspiration). Recovered oocytes were classified and matured. In vitro fertilization was performed using capacitated Gir bull semen. Twenty two hours after fertilization, presumptive zygotes were co-culture with granulosa cells in CR2aa supplemented with 10% of fetal calf serum. Cleavage rate was assessed at 72 hours post-fertilization, and blastocyst production 192 hours post-fertilization. Data were analyzed by Chi-square method. The rbST increased cleavage ($p < 0.05$) and blastocyst production. The results showed that using rbST improve in vitro embryo production in Gir zebu animals.

Bovine, In vitro embryo production, Gir breed, rbST.

KEYWORDS

bovine, in vitro embryo production, Gir breed, rbST

INTRODUÇÃO

A manipulação da dinâmica folicular em bovinos permite maior disponibilização de oócitos pela técnica de punção folicular. Um método possível de alterar a fisiologia ovariana é pelo uso de somatotropina bovina recombinante (rbST).

A rbST aumenta a população de folículos em animais de origem européia (BOLS et al., 1998), mas a eficiência na produção in vitro de embriões (PIVE) tem sido questionável (BEVERS et al., 1997; BOLS et al., 1998).

Tem sido evidenciado que a administração de rbST promove um aumento do IGF-1 no fluido folicular (ROTH et al., 2002), o que poderia melhorar a qualidade dos oócitos e, conseqüentemente, a maturação e a formação de blastocistos in vitro.

O uso da rbST antes do início das sessões de punção folicular pode ser um valioso recurso para aumentar o número de embriões produzidos in vitro em vacas Gir. Visto que a maioria dos relatos encontrados na literatura é proveniente de bovinos de origem européia, e que animais europeus e indianos diferem em vários aspectos em sua fisiologia reprodutiva, faz-se necessário à avaliação da resposta dos animais Gir ao tratamento com rbST. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a utilização do tratamento com antes das sessões de punção folicular, como meio de aumentar a produção in vitro de embriões em vacas da raça Gir.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas vacas (n=24) da raça Gir multíparas, não-lactantes, em boas condições reprodutivas e corporais, provenientes do rebanho da Embrapa Gado de Leite. Os animais foram inicialmente sincronizados pela administração intramuscular de 0,5 mg de cloprostenol, e durante o experimento receberam continuamente implantes auriculares contendo 3 mg de norgestomet, renovados a cada 14 dias. Posteriormente, os animais foram divididos em quatro grupos e cada grupo foi submetido aos dois tratamentos, sendo:

T1: Punção folicular sem estimulação hormonal (controle);

T2: Punção folicular após tratamento com 160 mg de rbST em aplicação única quatro dias antes de cada punção;

Foram realizados duas repetições para cada tratamento em todos os grupos (48 punções para cada tratamento).

As punções foliculares foram realizadas utilizando-se um aparelho de ultra-sonografia equipado com transdutor setorial intravaginal de 5 / 7,5 MHz e um dispositivo guia para punção folicular. Folículos com diâmetro superior a 3mm foram puncionados utilizando-se agulhas 19G e uma pressão de vácuo de 80 mmHg. Os complexos cumulus-oócito recuperados foram transferidos para placas de cultivo contendo DPBS acrescido de 10% de SFB a 37°C e avaliados em um microscópio estereoscópio.

Foram selecionados para o cultivo oócitos com no mínimo três camadas de células do cumulus compactas, citoplasma escuro e homogêneo ou apresentando pequenas irregularidades.

Os oócitos selecionados foram transportados em meio Talp-Hepes à uma temperatura de 39°C, e submetidos à maturação in vitro.

A maturação foi realizada em meio TCM-199 acrescido de 10% de soro de vaca em cio e 20µg/mL de FSH, por 22 horas, em estufa incubadora à 39°C com 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após a maturação, todos os oócitos foram fertilizados com sêmen congelado de um touro da raça Gir previamente selecionado. Para separação de espermatozoides vivos e mortos foi utilizado o método de swim up. A fecundação in vitro foi realizada em gotas de 100 µL de meio Fert-Talp acrescido de heparina, cobertas com óleo mineral, com concentração espermática de 2,0 x 10⁶ espermatozoides/mL por um período aproximado de 22 horas.

Os possíveis zigotos foram co-cultivados com células da granulosa em CR2aa acrescido de 10% SBF, em gotas de 50µL cobertas com óleo mineral. A avaliação da taxa de clivagem e a

renovação do 50% do meio foram realizadas 72 horas pós-fecundação. A taxa de produção de blastocisto foi avaliada 192 horas pós-fecundação. Todas as etapas foram realizadas em estufa incubadora nas mesmas condições da maturação in vitro. Foram utilizados grupos de 10 a 40 oócitos por gota de fecundação/cultivo.

Os dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A somatotropina parece melhorar a competência de desenvolvimento dos oócitos, visto que aumentou as taxas de clivagem ($P < 0,05$) (Tabela 1) e de produção de blastocistos ($P < 0,01$). GONG et al. (1996) também relatam que o tratamento com rbST tem melhorado a competência de desenvolvimento dos oócitos e a qualidade dos embriões em bovinos. O efeito benéfico do rbST no desenvolvimento embrionário pode estar relacionado a influências diretas ou indiretas no microambiente folicular e/ou no próprio oócito. Uma das mudanças obtidas através da administração de rbST é aumento das concentrações intrafoliculares de IGF-1 (ROTH et al., 2002), o que poderia resultar no aumento da eficiência do desenvolvimento embrionário in vitro.

Receptores de somatotropina e IGF-1 têm sido encontrados em oócitos bovinos imaturos, bem como nas células da granulosa e do cumulus, e a adição de rbST (IZADYAR et al., 1997) ao meio de maturação in vitro tem aumentado o número de mórulas e blastocistos. Sugere-se que o rbST melhore a maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos (BEVERIS et al., 1997). Além disso, o tratamento das doadoras de embriões com rbST reduz a proporção de oócitos não fecundados e aumenta o número de embriões transferíveis (THATCHER et al., 2001).

Outros autores, entretanto, não obtiveram aumento nas taxas de clivagem e produção de blastocistos após a utilização de rbST ou IGF-1 in vitro, bem como com o tratamento com rbST in vivo (BOLS et al., 1998). A utilização de diferentes sistemas de cultivo in vitro, diferenças nas doses de rbST usadas in vivo e in vitro e oócitos provenientes de animais de raças diferentes podem ser responsáveis pela obtenção de resultados divergentes.

CONCLUSÕES

- O uso do rbST antes das sessões de punção folicular mostrou ser uma alternativa para melhoria da produção in vitro de embriões em animais da raça Gir.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEVERIS, M.M., DIELEMAN, S.J., HURK, V.D.R., IZADYAR, F. . Regulation and modulation of oocyte maturation in bovine. *Theriogenology*, v. 47, p.13-22, 1997.
2. BOLS, P.E.J., YSEBAET, M.T., LEIN, A., CORYN, M. et al. . Effect of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in OPU-IVF program. *Theriogenology*, v.49, p.983-995, 1998.
3. GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A.; WILMUT, I. et al. . Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory responses to FSH in heifers. *Theriogenology*, v. 45, p 611-622, 1996.
4. IZADYAR, F.; VANTOL, H. T A.; COLENBRANDER, B. et al. . Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through cumulus cells and not mediated by IGF-I. *Molecular, Reproduction and Development*, v. 47, p. 175-180, 1997.
5. ROTH, Z.; ARAV, A.; BRAW-TAL, R. et al. . Effect of treatment with follicle-stimulating hormone or bovine somatotropin on the quality of oocyte aspirated in the autumn from previously heat-stressed cows. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 1398-1405, 2002.
6. THATCHER, W. W.; MOREIRA, F.; SANTOS, J. E.; et al. . Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*, v. 55, p. 75-89, 2001.

41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia
19 de Julho a 22 de Julho de 2004 - Campo Grande, MS

Tabela 1. Taxas de clivagem e produção de blastocistos de oócitos recuperados *in vivo* em vacas Gir não tratadas (T1) e tratadas com somatotropina bovina recombinante (T2) .

	T1		T2	
	n	%	n	%
Taxa de clivagem	77	46,11 ^b	78	60,47 ^a
Taxa de produção de blastocisto	13	7,78 ^b	25	19,38 ^a
Total de oócitos cultivados	167		129	

^{a, b} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si ($p < 0,05$)