

EFEITO DA PRÉ-ESTIMULAÇÃO COM FSH NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES NA RAÇA GIR1

AUTORES

ALESSANDRA A. RAMOS^{2,3}, WANDERLEI F. SÁ², ADEMIR M. FERREIRA², JOÃO HENRIQUE M. VIANA², LUIZ SÉRGIO A. CAMARGO², ISABELLA M. FOLHADELLA^{2,3}, RENATA S. OLIVEIRA²

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

Avaliou-se os efeitos do uso do FSH em vacas da raça Gir na produção in vitro de embriões. Foram utilizadas vacas não-lactantes, em boas condições reprodutiva e corporal. Os animais tiveram o ciclo estral sincronizado com cloprostenol e ao longo do experimento receberam implantes auriculares de norgestomet, renovados a cada 14 dias. Os animais foram submetidos ao tratamento I (controle) e II (pré-tratamento com 250 U.I. de FSH em doses decrescentes três dias antes da punção folicular). Os oócitos recuperados foram conduzidos ao laboratório em meio TALP-Hepes 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. Avaliou-se a taxa de clivagem 72 horas pós-fecundação e a de blastocisto 192 horas pós-fecundação. Os dados foram analisados pelo método Qui-quadrado. O FSH aumentou ($p < 0,05$) a taxa de clivagem, mas não melhorou a produção de blastocistos ($p = 0,072$).

PALAVRAS-CHAVE

bovinos, estimulação hormonal, competência oocitária

TITLE

EFFECT OF FSH PRESTIMULATION ON IN VITRO EMBRYO PRODUCTION IN GIR BREED

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of FSH on in vitro embryo production of Gir cows. Non-lactating cycling cows in good body and reproductive conditions were used. Estrous cycles were synchronized with cloprostenol. During the experiment, the animals received norgestomet ear implants, replaced every fourteen days. Animals were submitted to treatment I (control) and treatment II (pre-stimulation with 250 U.I. of FSH three days before aspiration.). Recovered oocytes were transported in Talp-Hepes to the laboratory, classified and matured. 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 FSH increased cleavage rate ($p < 0,05$), but did not improve blastocyst production ($p = 0,072$).

KEYWORDS

bovine, hormonal stimulation, oocyte competence

INTRODUÇÃO

A produção in vitro de embriões (PIVE) permite a produção de uma gestação por vaca/semana, podendo aumentar rapidamente o número de animais geneticamente selecionados e diminuir o intervalo de gerações. Além disso, a PIVE permite a manutenção de rebanhos mestiços com o grau de sangue desejado, o que não é possível com o uso da inseminação artificial.

Oócitos de boa qualidade são o primeiro requisito para o sucesso da PIVE. Em animais de raças européias, o tratamento hormonal das doadoras de oócitos com FSH tem aumentado o número de folículos viáveis para punção, embora os resultados na PIVE sejam conflitantes (GOODHAND et al., 1999; ROTH et al., 2002). A punção folicular em doadoras gonadotropina-estimuladas uma vez por semana é tão eficiente quanto um regime de duas punções semanais sem estimulação prévia. Oócitos de melhor qualidade têm sido obtidos em animais punccionados duas vezes/semana sem estimulação e uma vez/semana com estimulação (GOODHAND et al., 1999).

O uso do FSH antes das sessões de punção folicular pode aumentar a eficiência da PIVE. Entretanto, pouco se sabe sobre a reposta dos oócitos recuperados em vacas Gir após o tratamento hormonal. Considerando-se a importância dessa raça para a pecuária leiteira nos trópicos, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o pré-estímulo com FSH nas taxas de clivagem e produção in vitro de embriões em vacas dessa raça.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas vacas (n=15) da raça Gir multíparas, não-lactantes, em boas condições reprodutiva e corporal. Os animais tiveram o ciclo estral sincronizado pela administração intramuscular de 0,5 mg de cloprostenol, e ao longo do experimento receberam implantes auriculares contendo 3 mg de norgestomet, renovados a cada 14 dias. Após a sincronização, os animais, cinco de cada vez, foram submetidos aos seguintes tratamentos:

T1: Punção folicular duas vezes por semana sem estimulação hormonal (controle)

T2: Punção folicular uma vez por semana após tratamento com 250 U.I. de hormônio folículo estimulante (Pluset, Serono), distribuídos em seis aplicações em doses decrescentes (75, 50, 50, 25, 25, e 25 U.I.) administradas em intervalos de 12 horas nos três dias precedentes a cada sessão de punção.

Os animais foram divididos em grupos (n=5) e cada animal, de cada grupo, foi submetido primeiro ao T1 em duas repetições e, posteriormente, ao T2 por duas vezes (30 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 punccionados 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 in vitro os complexos cumulus-oócito apresentando um mínimo de três camadas de células do cumulus compactas, com citoplasma escuro e homogêneo ou apresentando pequenas irregularidades.

Os oócitos selecionados foram transportados para o Laboratório de Embriologia, em meio Talp-hepes à temperatura de 39°C em uma bolsa térmica. O tempo médio de transporte foi de 40 min. a uma hora.

Os oócitos foram submetidos à maturação in vitro 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 de 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.

Os dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento com FSH antes da punção folicular não aumentou ($p>0,05$) a taxa de recuperação de oócitos (tabela 1). A taxa de clivagem foi maior ($p<0,05$) para o T2 quando comparada com a do T1, mas o tratamento com FSH antes da punção folicular não aumentou a taxa final de produção de embriões ($p=0,072$) (tabela 1). Esses resultados são similares aos obtidos por outros autores (GOODHAND et al., 1999; ROTH et al., 2002). Sugere-se que o FSH beneficie o desenvolvimento embrionário por sincronizar a população folicular, adiantando o desenvolvimento dos folículos e iniciando a maturação in vivo do oócitos, o que levaria a um aumento da competência de desenvolvimento oocitária antes da recuperação dos mesmos (GIBBONS et al., 1994). Além disso, o tratamento com FSH pode alterar o ambiente folicular ao redor do oócito, influenciando direta ou indiretamente a qualidade do oócito (ROTH et al., 2002). O FSH exógeno aumenta a densidade de receptores de IGF-1 (SPICER et al., 1994) e diminui a quantidade de proteínas ligadoras de IGF – 2 (IGFBP-2) em folículos bovinos (ECHTERNKAMP et al., 1994). Sendo assim, o maior desenvolvimento folicular e um aumento na biodisponibilidade e bioatividade do IGF-1 FSH-induzidos poderiam estar associados à maior competência de desenvolvimento dos oócitos provenientes do T2.

Outros autores não têm observado efeitos benéficos do pré-estímulo com FSH antes da punção folicular para PIVE (BLONDIN et al., 1996). O efeito do FSH no desenvolvimento embrionário pode ser influenciado pelo modo de administração e pela frequência de aspiração. Múltiplas doses de FSH têm sido mais eficientes que uma simples administração, e melhores resultados têm sido obtidos com uma punção semanal em animais pré-estimulados com FSH (GOODHAND et al., 1999), similar ao protocolo utilizado no presente experimento.

CONCLUSÕES

O uso do FSH antes das sessões de punção folicular não afeta a taxa de recuperação dos oócitos, mas aumenta a taxa de clivagem em animais da raça Gir.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUIBAULT, L. A. et al. . Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. *Theriogenology*, v. 46, p. 1191-1203, 1996.
2. ECHTERNKAMP, S. E.; HOWARD, H. J.; ROBERTS, A. J. et al. . Relationships among concentrations of steroids, insulin-like growth factor-I and insulin-like binding proteins in ovarian follicular fluid of beef cattle. *Biology of Reproduction*, v. 51, p. 971-981, 1994.
3. GIBBONS, J. R.; BEAL, W. E.; KRISHER, R. L. et al. . Effect of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, v. 42, p. 405-419, 1994.
4. GOODHAND, K. L.; WATT, R. G.; STAINES, M.E. et al. . In vivo recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*, v. 51, p. 951-961, 1999.
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.

41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

19 de Julho a 22 de Julho de 2004 - Campo Grande, MS

6. SPICER, L. J.; ALPIZAR, A.; VERNON, R. K. . Insulin-like growth factor-I receptors in ovarian granulosa cells: effects of follicular size and hormones. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 102, p. 69-76, 1994.

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

	T1		T2	
	n	%	n	%
Taxa de recuperação de oócitos	292	71,39	267	67,09
Taxa de clivagem	90	44,78 ^a	93	56,02 ^b
Taxa de produção de blastocisto	23	11,44 ^a	30	18,07 ^a
Total de oócitos cultivados	201		166	

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