

EFEITO DA PROGESTERONA EXÓGENA EM VACAS DOADORAS DE OVÓCITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

SCHNEIDER, Augusto¹; PFEIFER, Luiz Francisco M. ¹; RUMPF, Rodolfo²; PIVATO, Ivo²; DIONELO, José Laurino³; CORRÊA, Marcio Nunes¹

¹Faculdade de Veterinária – NUPEEC

² EMBRAPA - CENARGEN Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Faculdade de Agronomia – Depto. de Zootecnia

Campus Universitário – CEP 96010-900. arthron@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O grande avanço obtido na área de biotecnologia da reprodução tem permitido o desenvolvimento de técnicas que aumentam a eficiência reprodutiva e o ganho genético em rebanhos bovinos, bem como, permitem o estudo e aperfeiçoamento de técnicas de reprodução assistida. Entretanto, os protocolos e métodos utilizados ainda requerem aperfeiçoamentos [1]. Neste âmbito a punção folicular (PF) guiada por ultra-som, apesar dos progressos que vem obtendo, tem baixa eficiência da produção de embriões transferíveis [15].

Estes baixos resultados têm sido atribuídos às condições de maturação e fertilização *in vitro*, porém existem indicações de que este fato esteja mais relacionado com a qualidade dos ovócitos do que com as condições de fertilização e cultivo *in vitro* e/ou devido ao método de maturação *in vitro* dos ovócitos coletados [9]. Alguns estudos indicam que ovócitos oriundos de folículos que tiveram seu desenvolvimento na fase de diestro do ciclo estral são de melhor qualidade, sugerindo que ovócitos desenvolvidos em um ambiente com maior concentração de progesterona (P4) seriam de melhor qualidade [3,9]. Alguns trabalhos sugerem que a progesterona tem importante função na qualidade embrionária [10,2].

Este estudo teve o objetivo de avaliar o número de folículos aptos à PF, a quantidade e a qualidade de ovócitos, bem como a produção de embriões *in vitro* de vacas doadoras de ovócitos submetidas à diferentes tratamentos com dispositivos liberadores de progesterona (CIDR[®]).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste experimento foram utilizadas 15 vacas mestiças (*bos taurus x bos indicus*), com condição corporal (CC) entre 3 e 3,5, em regime de pastagem (*Brachiaria brizanta*) recebendo suplementação mineral (sal proteinado – EMBRAPA Cerrados). Antes do início do experimento, todas as vacas receberam um CIDR[®] (dispositivo de silicone em forma de T liberador de progesterona) (1,9 g de progesterona/dispositivo) por 8 dias. Dois dias antes da retirada dos dispositivos, todas as vacas receberam 0,150 mg de D-cloprostenol. No dia da retirada dos CIDR[®]s todas vacas foram submetidas à PF, para haver a padronização do crescimento folicular. Após esta 1^o PF as vacas foram divididas aleatoriamente em 3 grupos (n = 5, cada) distintos e todas submetidas à PF a cada 4 dias totalizando 6 sessões. Os três grupos receberam a cada 8 dias 0,150 mg de D-cloprostenol.

G1: recebeu 1 CIDR usado, para obtenção de baixos níveis de progesterona sérica. Como este grupo já estava a 8 dias com um dispositivo, permaneceu com o mesmo CIDR por mais 8 dias. O CIDR foi trocado no intervalo entre 2 PFs de forma

que foram utilizados 3 CIDRs por vaca durante as 6 PFs. As outras 2 trocas de CIDR foram feitas utilizando os dispositivos que haviam sido usados pelas vacas dos outros grupos no início dos tratamentos.

G2: os animais deste grupo, após a retirada do CIDR, receberam 2 dispositivos, para obtenção de níveis mais altos de progesterona. Os CIDRs foram trocados a cada 8 dias juntamente com as aplicações de D-cloprostenol.

G3: os animais deste grupo não foram submetidos à tratamentos com progesterona e somente receberam D-cloprostenol, a cada 8 dias.

A PF foi realizada via transvaginal com um aparelho de ultrassonografia. Os ovócitos foram aspirados em tubo *Corning* de 50 mL e o material obtido filtrado (filtro millipore para embrião) para facilitar a procura dos ovócitos.

Os ovócitos obtidos eram classificados em 4 categorias com base na integridade da camada do cumulus e uniformidade e coloração do citoplasma.

Os protocolos utilizados para maturação, fertilização e cultivo embrionário *in vitro* foram adaptados de Dode *et al.* (2002) [7].

Para maturação os CCOs foram lavados e transferidos para uma placa contendo 2 ml de meio de maturação coberto com 2 ml de óleo de parafina e incubados por 22 horas a 39°C e 5% de CO₂ em ar.

Após os ovócitos foram lavados e transferidos para gotas de 200 µl de meio de fecundação, para que se realizasse a FIV. Após a avaliação da concentração, o sêmen foi adicionado à gota de fecundação em uma concentração final de 1 x 10⁶ espermatozóides/ml. Os ovócitos e os espermatozóides são co-incubados por 22 horas em estufa a 39°C e 5% de CO₂ em ar.

Para o cultivo *in vitro* foi utilizado o meio SOFaa, 0,34 mM de sodium tri citrato (Sigma[®]), 2,77 mM myo-inositol (Sigma[®]) e 5% de soro fetal bovino (SFB).

A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa estatístico SAS[®] (1991) [14].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 702 folículos foram puncionados durante as 6 sessões de PF realizadas no experimento, sendo registrado 271, 253 e 178 folículos para o G1, G2 e G3, respectivamente. A taxa de recuperação ovocitária média foi de 60,11%. A taxa de clivagem foi de 62,16% (184) do total de CCOs submetidos à FIV (296), com um número total de blastocistos de 20,60% (61).

Foi observado um aumento ($p < 0,01$) na média de folículos pequenos, com diâmetro de até 5 mm, no G1 (9,44) e G2 (9,44) em relação ao G3 (6,12). Já para o número de folículos entre 5 e 10 mm e maiores que 10 mm, não foi detectada diferença ($p > 0,05$).

A média de folículos totais por vaca por punção foi de 10,84, 10,12 e 7,12 para o G1, G2 e G3, respectivamente, sendo que o G1 e G2 não diferiram ($p > 0,05$) entre si apresentando, porém, uma média superior ($p < 0,0001$) de folículos em relação ao G3. A média de ovócitos coletados/vaca/punção foi superior ($p < 0,01$) no G1 (6,56) e no G2 (6,96) em relação ao G3 (3,36).

A taxa de recuperação ovocitária, ou seja, número de ovócitos coletados/número de folículos disponíveis foi de 60,51%, 68,77% e 47,19%, para o G1, G2 e G3, respectivamente. Não houve diferença ($p > 0,05$) na taxa de recuperação entre o G1 e G2 e entre o G1 e o G3, porém, houve, entre o G2 e G3 ($p < 0,05$). A taxa de recuperação foi influenciada pelo fator individual do animal, pelo tratamento e pela coleta ($p < 0,05$).

A média superior de ovócitos coletados/vaca/punção do G1 e G2 para o G3, assim como o aumento dos ovócitos coletados em sessões de PF registrados por Campos [5] indicam que a presença de diferentes níveis de progesterona pode influenciar na foliculogênese, o que pode ser observado através da diferença no número de folículos registrados nas vacas que receberam P4 em relação às vacas do G3, as quais, provavelmente, apresentavam baixos ou até mesmo níveis plasmáticos não detectáveis de P4. O fato da progesterona determinar uma pulsatilidade de LH de baixa frequência [12], de acordo com o recrutamento folicular apresentado nas vacas que receberam CIDR[®], indica que os folículos podem estar somente sob ação do FSH. O mecanismo de estímulo de pequenos folículos antrais ainda não é bem conhecido [6,13], sendo que a maioria dos folículos que se apresentavam no momento das PFs eram de folículos antrais menores que 5 mm, os quais possuem pouca influência das gonadotrofinas.

Em relação à qualidade dos CCO's foi registrada diferença ($p < 0,05$) na média de ovócitos de qualidade I e II por punção entre os grupos, sendo $13 \pm 0,5$ para G1, $5,6 \pm 0,5$ para o G2 e $2,6 \pm 0,5$ para o G3. Para ovócitos de qualidade III e IV observou-se uma maior ($p < 0,05$) recuperação de ovócitos no G2 ($5,84 \pm 2,77$) quando comparado ao G1 ($3,96 \pm 2,77$) e ao G3 ($3,08 \pm 2,77$). Porém, não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre o G1 e o G3.

Foi registrado diferença ($p < 0,05$) na taxa de clivagem dos ovócitos de qualidade I e II entre o G1 e os demais grupos, não havendo diferença ($p > 0,05$) do G2 para o G3, sendo de 80% ($10,4 \pm 2$), 75% ($4,2 \pm 2$) e 61,5% ($1,6 \pm 2$), respectivamente. Não houve diferença ($p > 0,05$) na taxa de clivagem dos ovócitos de qualidade III entre os grupos, sendo de 52% ($5,4 \pm 1,87$), 59,3% ($10,8 \pm 1,87$) e 47% ($4,4 \pm 1,87$), para o G1, G2 e G3, respectivamente. Já a taxa de clivagem total foi maior ($p < 0,05$) para o G1, 67,5% ($15,8 \pm 2,39$) e G2, 63% ($15 \pm 2,39$), em relação ao G3, 50% ($6 \pm 2,39$). Sendo que não houve diferença ($p > 0,05$) entre o G1 e G2.

Foi registrado um aumento ($p < 0,05$) na taxa de blastocistos oriundos de ovócitos de qualidade I e II apenas do G1 para o G3, 46,15% ($6 \pm 2,03$) e 15,38% ($0,4 \pm 2,03$), respectivamente. Sendo que o G2 não apresentou diferença ($p > 0,05$), 32,14% ($1,8 \pm 2,03$), dos demais grupos. Sendo que, em relação a taxa de blastocistos de ovócitos de qualidade III, não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$), sendo de 6% ($0,6 \pm 0,88$), 11% ($2 \pm 0,88$) e 15% ($1,4 \pm 0,88$), para o G1, G2 e G3, respectivamente. Não foi detectada diferença ($p > 0,05$) na taxa total de blastocistos entre os grupos G1, G2 e G3, sendo: 28,20% ($6,6 \pm 2,15$), 16% ($3,8 \pm 2,15$) e 15% ($1,8 \pm 2,15$), respectivamente.

A partir destes resultados é possível inferir sobre a existência de um nível de P4 adequado, capaz de influenciar a qualidade ovocitária mesmo que de forma indireta. Este fato pode estar relacionado com a frequência dos pulsos de LH e dos níveis de atresia de cada tratamento. O G1, possivelmente apresenta um padrão pulsátil de LH maior do que o G2, indicando uma moderada atresia causada por estes pulsos de LH. Este aspecto é discutido por alguns estudos [11,4] que sugerem melhoria da competência ovocitária em função de um baixo nível de atresia. Greve *et al.* [8] mencionam que a progesterona permite que o folículo seja exposto por um maior período a pequenos pulsos de LH podendo melhorar a qualidade ovocitária.

4. CONCLUSÃO

A partir destes resultados foi possível verificar que vacas tratadas com implantes de progesterona apresentam aumento da quantidade de ovócitos, bem como da disponibilidade de folículos na PF, aumentando também a média de

ovócitos de qualidade I e II recuperados e a taxa de produção de blastocistos nas doadoras do G1. A taxa de clivagem total foi maior quando as vacas foram expostas a progesterona, porém não houve diferença na taxa de blastocistos total entre os grupos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADAMS, GP Comparative pattern of follicle development and selection in ruminants. J Reprod Fertil Suppl 1999; 54:17–32.
- [2] BÓ, GA, TRÍBULO, H, CACCIA, M, TRÍBULO, R. Pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone vaginal devices and transferred without estrus detection. Theriogenology 2001; v. 55, p. 357 (abstr).
- [3] BLONDIN, P, SIRARD, A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. Mol Reprod Dev 1995; 41,54-62.
- [4] CAMPBELL, BK, PICTON, HM, MANN, GE, MCNEILLY, AS, BAIRD, DT. Effect of steroid- and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicles and ovarian hormone secretion. J Reprod Fert 1991; 93, 81–96.
- [5] CAMPOS, HCF. Avaliação do efeito residual da superovulação sobre a produção *in vitro* de embriões em sessões de punção folicular subsequentes. Tese. Reprodução Animal. Universidade de Brasília 2004, 55p. Brasília, DF.
- [6] CUSHMAN, RA, DESOUZA, JC, HEDGPETH, VS., BRITT, JH. Alteration of activation, growth, and atresia of bovine preantral follicles by long-term treatment of cows with estradiol and recombinant bovine somatotropin. Biol Reprod 2001; 65, 581–586.
- [7] DODE, MAN, RODOVALHO, NC, UENO, VG, FERNANDES, CE. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *bos indicus* oocytes. Anim Reprod Sci 2002; 69. 15–23.
- [8] GREVE T, HYTTEL P, ASSEY R. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. Theriogenology 1995; 43: 41-50.
- [9] LEIBFRIED-RUTLEDGE, ML, CRITSER, WH, EYESTONE, DL, FIRST, NL. Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. Biol Reprod 1987; 36: 376-383.
- [10] MACMILLAN, KL, TAUFA, VK, HAYMAN, DL. Pregnancy rates in lactating dairy cows used as recipients for frozen/thawed embryos and receiving supplemental progesterone. New Zealand Embryo Transfer Workshop, Hamilton, NZ, 1994. p. 34-35.
- [11] MATTON, P, ADELAKOUN, V, COUTURE, Y, DUFOUR, JJ. Growth and replacement of bovine ovarian follicles during the estrous cycle. J Anim Sci 1981; 37, 48–53.
- [12] RAHE, CH., OWENS, RE., FLEEGER, JL., NEWTON, HJ. HARMS, PG. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. Endocrinology 1980; 107: 498-503.
- [13] ROTH, Z, ARAV, A, BOR, A, ZERON, Y, BRAW-TAL, R, WOLFENSON, D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. Reproduction 2001; 122, 737–744.
- [14] SAS®. SAS/STAT User's Guide (Release 6.03). SAS Inst. Inc., Cary, NC. 1991.
- [15] WIT, AAC, WURTH, YA, KRUIP, ThAM. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. J Anim Sci 2000; 78: 1277-1283.