

Aspiração folicular em vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* e vitrificação dos oócitos em condições de campo

Bos taurus and *Bos indicus* follicular aspiration and oocytes vitrification at field conditions

Fabiano Buss Cruz¹, Leonardo Tondello Martins¹, Luciana Simões Rafagnin Marinho¹, Fabiana Forell², Arnaldo Diniz Vieira³, Alceu Mezzalira⁴

Recebido em 17/06/2009; aprovado em 23/09/2009.

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a viabilidade da criopreservação de oócitos de fêmeas taurinas e zebuínas em condição de campo, este estudo determinou a taxa média de oócitos obtidos por punção folicular *in vivo* (OPU) de fêmeas bovinas *Bos taurus taurus* (Devon) e *Bos taurus indicus* (Nelore), bem como o desenvolvimento embrionário após a vitrificação destes oócitos. Em 60 sessões, obteve-se média de 4,6 oócitos por sessão de OPU nas vacas Devon, número significativamente inferior aos 16,3 oócitos obtidos nas vacas Nelore, em 12 sessões. Os oócitos selecionados foram vitrificados em solução de 20% de EG + 20% de DMSO + 0,5 M de sacarose, em meio TCM 199, utilizando-se palhetas estiradas (OPS). O reaquecimento foi efetuado em laboratório, seguindo-se a maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. As taxas de clivagem obtidas foram 17,6% no grupo de vacas Devon e 29,1% no grupo Nelore, não havendo diferença significativa entre as mesmas. Na avaliação do desenvolvimento embrionário, obteve-se apenas um blastocisto no grupo Devon. Concluiu-se que fêmeas zebuínas (Nelore) proporcionam maior taxa de oócitos recuperados por sessão em relação às fêmeas taurinas (Devon), e que a associação da OPU com a vitrificação dos oócitos na própria fazenda não proporciona taxas aceitáveis de desenvolvimento embrionário, independente da origem dos animais.

PALAVRAS-CHAVE: oócitos, aspiração folicular, vitrificação à campo, Nelore, Devon.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the viability of cryopreservation of bovine oocytes from *Bos taurus* and *Bos indicus* cows, at field conditions. The average rate of oocyte recovered by Ovum Pick up (OPU) from *Bos taurus taurus* cows (Devon) or *Bos taurus indicus* cows (Nelore), and the embryo development after vitrification were determined. After 60 sessions, an average rate of 4.6 oocytes/session was obtained from Devon cows. This number was significantly lower than the 16.3 oocytes obtained from Nelore cows, in 12 sessions. Selected recovered oocytes were vitrified in 20% EG + 20% DMSO + 0.5 M sucrose, in TCM 199 medium, with open pulled straws (OPS) technology, and stored in a cryogenic container. Just after warmed, oocytes were submitted to standard *in vitro* maturation, fertilization and culture in the laboratory. There were no differences in cleavage rates obtained from Devon cows oocytes (17.6%) and Nelore cows oocytes (29.1%). Evaluation of embryo development resulted in only one blastocyst obtained from Devon cows. Data from this study showed that *Bos taurus indicus* cows had higher oocytes recovery rates when compared with *Bos taurus taurus*, and that association of OPU with oocytes vitrification at farm conditions resulted in

¹ Médico Veterinário alunos Mestrado em Ciência Animal - UDESC / CAV - Lages SC.

² Médico Veterinário - Aluna Pós-Doc - Bolsista PNPd Capes.

³ Médico Veterinário - Professor Universidade Federal de Pelotas - UFPEL - Pelotas RS.

⁴ Médico Veterinário - Professor CAV / UDESC - Lages SC (autor para correspondência). E-mail: mezzalira@cav.udesc.br.

unsatisfactory indexes of embryo development, regardless of cow breed.

KEY WORDS: oocytes, follicular aspiration, farm vitrification, Nelore, Devon.

A técnica de punção folicular guiada por ultrasonografia (Ovum Pick Up - OPU) é amplamente utilizada no Brasil, consistindo numa metodologia pouco invasiva, de alta repetibilidade, além de proporcionar oócitos de boa qualidade (SENEDA et al., 2003). Associada à produção *in vitro* de embriões (PIV), a OPU possibilita o uso de fêmeas senis (BROGLIATTI e ADAMS, 1996), pré-púberes (ADAMS et al., 1994), em início de gestação (BUNGARTZ et al., 1995) ou com infertilidade adquirida (VIANA et al., 2004). Entretanto, o reinício da meiose após a punção do folículo ovariano, condiciona o sucesso da OPU/PIV à disponibilidade de um laboratório. Na maioria dos casos os animais devem ser transportados até a proximidade dos laboratórios, ou como alternativa, utilizam-se deslocamentos de alto custo, como viagens aéreas, para o transporte dos oócitos.

A criopreservação dos oócitos pode ser uma alternativa viável, já que produz a parada da maturação, podendo otimizar significativamente a logística dos programas de OPU/PIV. Embora as características biológicas dos oócitos limitem a eficiência da criopreservação (LEDDA et al., 2001), existem relatos da produção de blastocistos (MARTINO et al., 1996; SANTOS et al., 2006; BUNN et al., 2008) e do nascimento de produtos saudáveis (VAJTA et al., 1998, VIEIRA et al., 2002), demonstrando que o método é promissor. Entretanto, não existem dados relativos à criopreservação de oócitos bovinos imaturos, obtidos de animais vivos, e realizada na própria fazenda.

Este estudo quantificou o número médio de oócitos recuperados por OPU, em fêmeas taurinas e zebuínas, bem como avaliou a viabilidade do processo de vitrificação destes oócitos, em condições de campo. Foram realizadas 60 sessões de OPU em doadoras Devon (n=24), com intervalo mínimo entre sessões de 3 dias. Nas doadoras Nelore (n=06), realizaram-se 12 sessões com intervalos de 15 dias. Foi utilizado um aparelho de ultra-som Falcon 100

(Pie Medical), equipado com transdutor linear de 8 MHz, acoplado a uma guia de punção transvaginal, sendo aspirados todos os folículos visíveis. O vácuo foi produzido com uma bomba de infusão (Nutrimat II), com fluxo de aspiração de 10 mL de água por minuto. O fluido folicular aspirado seguia por canos de silicone até tubos cônicos de 50 mL (Falcon), contendo 10 mL de DPBS aquecido e adicionado de 50 UI/mL de heparina (Liquemine®).

Todas as sessões de OPU, assim como a busca e seleção dos oócitos foram realizadas pelo mesmo operador. Os oócitos selecionados eram transferidos para o meio TCM-199 adicionado de Hepes + 10% de soro de égua em estro (SEE), onde permaneciam até o momento da vitrificação. Esta foi realizada em palhetas estiradas (OPS), com os oócitos expostos por 30 segundos a uma solução de 10% de Etileno Glicol (EG) + 10% de Dimetil Sulfoxido (DMSO) em meio TCM 199 tamponado com Hepes + 20% de soro de égua em estro (SEE). A seguir, os oócitos eram transferidos para a solução de vitrificação, (20% de EG + 20% de DMSO + 0,5 M de sacarose), em meio TCM 199, por 20 segundos, envasados, mergulhados em nitrogênio líquido e armazenados em botijão criogênico. O reaquecimento foi realizado em laboratório, sendo cada OPS exposta ao ar, por 4 segundos, e em seguida mergulhada em solução de 0,30 M de Sacarose em TCM 199, por 5 minutos. Após, foram transferidos para a solução de 0,15 M de Sacarose, por mais 5 minutos, antes de serem depositados no meio de maturação. A maturação foi realizada em meio TCM 199 adicionado de 26,2mM de NaHCO₃, 25mM de Hepes, 0,2mM de Piruvato de Sódio, 0,01UI de FSH/mL, 0,5µg/mL de LH e 10% de SEE, por 24 horas.

A fecundação *in vitro* foi realizada com sêmen de comprovada fertilidade para a PIV, sendo os espermatozoides selecionados pelo método de migração ascendente (*swim-up*), em meio TALP-Sperm. Os oócitos foram incubados com $1,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL por 18 horas, em meio TALP Fert, adicionado de 6mg/mL de BSA + 30µg/mL de heparina e PHE. Após a fecundação, os possíveis zigotos foram submetidos ao desnudamento e depositados em placas Nunc com 400µL do meio SOFaaci + 5% SEE, sob óleo mineral. Todos os procedimentos de cultivo foram realizados em estufa

a 39°C com 5% de CO₂ e umidade saturada.

Procedeu-se a avaliação da taxa de clivagem (dia 2) e taxa de blastocistos (dia 7). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os dados de clivagem e blastocistos ao teste X², com nível de significância de 5%.

O número médio de oócitos recuperados por sessão na raça Devon foi de 4,6 oócitos, estatisticamente inferior (P<0,05) aos 16,3 oócitos obtidos na raça Nelore. Apesar de não haver dados da raça Devon, os 4,6 oócitos obtidos por sessão neste trabalho são semelhantes aos reportados em outras raças européias como Angus e Blonde D'Aquitane (SENEDA et al., 2003; CHAUBAL et al., 2006). Os resultados obtidos na raça Nelore foram semelhantes aos obtidos por Rubin et al. (2005).

Não houve diferença na taxa de clivagem (P>0,05) dos oócitos vitrificados das fêmeas Devon (17,6%) e das fêmeas Nelore (29,1%). Na avaliação do desenvolvimento embrionário, observou-se apenas um embrião no estágio de blastocisto, proveniente de vaca Devon. Estes resultados são inferiores aos obtidos anteriormente em nosso laboratório (40-50%), por Vieira et al. (2002), Santos et al. (2006) e Bunn et al. (2008), com semelhante metodologia, porém utilizando oócitos imaturos obtidos de ovários de abatedouros e condições adequadas de laboratório.

Ao menos em parte, os resultados pobres obtidos podem dever-se a variabilidade das estruturas recuperadas, bem como aos danos à integridade dos oócitos, determinada pela punção, bem como e principalmente ao tempo excessivo decorrido desde a aspiração até o processo de vitrificação dos oócitos, já que todos os procedimentos foram realizados pela mesma pessoa. Sobretudo, o laboratório improvisado na fazenda não dispunha das condições mínimas necessárias à manipulação e vitrificação dos oócitos.

As informações obtidas nesse estudo demonstram que existe uma diversidade de fatores que podem interferir na eficiência da produção *in vitro* de embriões, especialmente quando se utilizam oócitos imaturos criopreservados. Apesar da baixa viabilidade observada nos resultados, informações como a necessidade de uma equipe de trabalho e condições mínimas de laboratório na fazenda, constituem subsídios importantes para trabalhos futuros, nos quais

o efeito de cada fator adverso deverá ser avaliado, para permitir a adequação dos procedimentos de OPU associado à criopreservação dos oócitos, em condições de campo.

Conclui-se que fêmeas zebuínas (raça Nelore) proporcionam maior número de oócitos recuperados por sessão em relação às fêmeas taurinas (raça Devon), e que a associação da OPU com a vitrificação dos oócitos na própria fazenda, não proporciona taxas aceitáveis de desenvolvimento embrionário se não forem atendidas condições mínimas de higiene e estrutura laboratorial, independente da origem dos oócitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G. P.; EVANS, A. C. O.; RAWLINGS, N. C. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, London, v. 100, p. 27-33, 1994.
- BROGLIATTI, G. M.; ADAMS, G. P. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. **Theriogenology**, New York, v. 45, p. 1163-1176, 1996.
- BUNGARTZ, L. et al. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. **Theriogenology**, New York, v. 43, p. 667- 675, 1995.
- BUNN, S. et al. Aumento na sobrevivência após vitrificação de oócitos bovinos imaturos em recipientes com maior condutividade térmica e nitrogênio super-resfriado. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 36, p.255-261, 2008.
- CHAUBAL, S. A. et al. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. **Theriogenology**, New York, v. 65, p. 1631-1648, 2006.
- LEDDA, S. et al. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. **Theriogenology**, New York, v. 55, p. 1359-1371, 2001.
- MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 54, p. 1059-1069, 1996.

RUBIN, K. C. P. et al. Influence of Nelore blood on the *in vitro* production of oocytes. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 19., 2005, Angra dos Reis, RJ. **Anais...** Angra dos Reis: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 2005, p. 183.

SANTOS, R. M. et al. Vacuum-cooled liquid nitrogen increases the developmental ability of vitrified-warmed bovine oocytes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 5, 2006.

SENEDA, M. M. et al. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, New York, v. 59, p. 1435-40, 2003.

VAJTA, G. et al. Open Pulled Straw (OPS) Vitrification: A New Way to Reduce Cryoinjuries of Bovine Ova and Embryos. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 51, p. 53-58, 1998.

VIANA, J. H. M. et al. **Punção folicular e produção *in vitro* de embriões em vacas Gir submetidas à estimulação hormonal.** Juiz de Fora: EMBRAPA, 2004. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 14.

VIEIRA, A.D. et al. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiology**, York, v. 45, p. 91-94, 2002.