



Aumento da qualidade de ovócitos recuperados por punção folicular de vacas submetidas previamente à superovulação

Increasing of oocytes quality retrieved by ovum pick-up from cows previously superovulated

L.F.M. Pfeifer^{1,6}, H. Campos², J.C. Miguel Jr.³, L.L. Silveira², A. Schneider⁴, M.N. Correa⁴, R. Rumpf⁵

¹Embrapa - Rondônia, Porto Velho, RO, Brasil.

²Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

³Médico Veterinário, Brasília, DF, Brasil.

⁴Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

⁵Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

⁶Correspondência: luiz@cpafro.embrapa.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade de ovócitos obtidos por meio de punção folicular de vacas doadoras submetidas à superovulação após a coleta de embriões. Foram utilizadas 22 vacas mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*), que foram divididas em dois grupos: 1) grupo-controle (GC; n = 11), composto por vacas em fase aleatória do ciclo estral, pois não sofreram nenhum tratamento hormonal, e 2) grupo corpos lúteos (GCL; n = 11), vacas que haviam sido utilizadas em um programa de superovulação e coleta de embriões. Todas as vacas foram submetidas à punção folicular ovariana a cada sete dias após a coleta de embriões do GCL, totalizando cinco seções de punção por grupo. Houve uma maior taxa de recuperação de ovócitos de qualidade I e II no GCL do que no GC (28,6 e 6,4%, respectivamente; P < 0,001). Os resultados indicam que ovócitos recuperados após um programa de superovulação e coleta de embriões apresentam melhor qualidade do que ovócitos coletados em fase aleatória do ciclo estral.

Palavras-chave: ovócitos, corpo lúteo, superovulação prévia.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the oocyte quality retrieved by ovum pick-up (OPU) after the embryo collection in cows subjected to superovulation procedure. Twenty two crossbred cows were separated into two groups; 1) Control Group (CG; n = 11), cows in random stage of the estrous cycle that did not received any hormonal treatment and 2) Corpus Luteum Group (CLG; n = 11), cows that had been used in a superovulation protocol and embryo collection. All cows were subjected to OPU procedure every 7 days after embryo collection of the CLG. The CLG had higher rate of oocytes quality I and II retrieved than the CG (28.6 and 6.4%, respectively; P < 0.001). The results indicate that oocytes retrieved from cows subjected to protocols of superovulation and embryo collection are of better quality than oocytes collected in random stage of the estrous cycle.

Keywords: progesterone, corpus luteum, previous superovulation.

Introdução

A técnica de punção folicular guiada por ultrassom possibilita maximizar o aproveitamento de ovócitos que fisiologicamente sofreriam atresia, mas que possuem potencial de produção de embriões *in vitro* (Bousquet et al., 1999). Apesar do grande avanço obtido na área de biotecnologia da reprodução, a eficiência da produção de embriões transferíveis, oriundos de fecundação *in vitro* (FIV), ainda é baixa (de Wit et al., 2000; Havlicek et al., 2010). Existem fortes indicações de que este fato esteja mais relacionado com a fonte de ovócitos do que com as condições de fecundação e cultivo *in vitro* (Bols et al., 1997) e/ou devido ao método de maturação *in vitro* dos ovócitos coletados (Leibfried-Rutledge et al., 1987).

Alguns estudos indicam que a progesterona plasmática afeta a qualidade ovocitária (Leibfried-Rutledge et al., 1987; Blondin et al., 1997; Hagemann et al., 1999; Salamone et al., 1999; Hendriksen et al., 2004; Pfeifer et al., 2009), pois ovócitos coletados na fase tardia de diestro são mais competentes que ovócitos coletados no início do diestro ou na fase folicular do ciclo estral, onde a concentração de progesterona é mais baixa (Machatkova et al., 1996, 2004).

Alta concentração de progesterona pode ser detectada em vacas doadoras após a coleta de embriões, pois possuem múltiplos corpos lúteos (CLs). Neste âmbito, a aplicação de uma dose convencional de prostaglandina F2

alfa ($\text{PGF}_2\alpha$; 0,150mg de D-cloprostenol) no dia da coleta pode resultar em luteólise parcial dos corpos lúteos (Levy et al., 2000; Castilho et al., 2009). Considerando-se tais afirmações, um aumento da concentração de progesterona no período pós-coleta de embriões pode ter interessante aplicabilidade no intuito de aumentar a qualidade dos ovócitos recuperados *in vivo*, visto que a concentração moderada de P_4 plasmática aumenta a qualidade dos ovócitos (Pfeifer et al., 2009).

O objetivo deste estudo foi verificar se a presença dos corpos lúteos remanescentes após a coleta de embriões influencia a qualidade dos ovócitos.

Material e Métodos

Todos os procedimentos realizados neste experimento foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (Protocolo 23110.004382/2010-89). O experimento foi realizado no Setor de Campo Experimental Fazenda Sucupira da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, no período de transição entre a época seca e a chuvosa em região de cerrado. Foram utilizadas 22 vacas múltiparas, mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*), com peso entre 380 e 420 kg e escore de condição corporal entre 3 e 3,5, em regime de pastagem (*Brachiara brizanta*) com suplementação mineral. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo-controle (GC; n = 11) e grupo corpos lúteos (GCL; n = 11). O GC foi composto de vacas com ciclicidade estral regular e que não sofreram nenhum tipo de tratamento hormonal. O GCL era composto por vacas que haviam sido submetidas a protocolos de superovulação e coleta de embriões. O protocolo de superovulação consistiu da inserção de um implante de progesterona (CIDR[®]; 1,9 g, InterAg- Hamilton, New Zealand, marketed by Pfizer, New York, NY, USA) no dia 0, seguido da aplicação de 2mL de benzoato de estradiol (2mg Estrogin[®]; Farmavet, i.m.) no dia 2. No dia esperado da nova onda folicular, \pm dia 7 do protocolo, foi iniciado o tratamento superestimulatório, sendo aplicado um total de 250UI de FSH:LH (PLUSET[®]; Hertape Calier, i.m.), duas vezes ao dia, em doses decrescentes. No dia 8, o CIDR foi retirado, e 0,150mg de análogo de prostaglandina (D-cloprostenol; Prostaglandina Tortuga, Santo Amaro, SP, Brasil, im) foi aplicado (Fig. 1). As vacas do GCL foram inseminadas duas vezes com intervalo de 12 horas após a detecção de estro. A coleta de embriões foi realizada sete dias após a inseminação. No dia da coleta dos embriões, as vacas do GCL receberam aplicação de 0,150mg de D-cloprostenol. Os dois grupos foram submetidos à PF a cada sete dias após a coleta de embriões do GCL, totalizando cinco seções de PF por grupo. Durante cada seção de PF, também foi realizada a ultrassonografia dos ovários para avaliação da presença do CL em ambos os grupos.

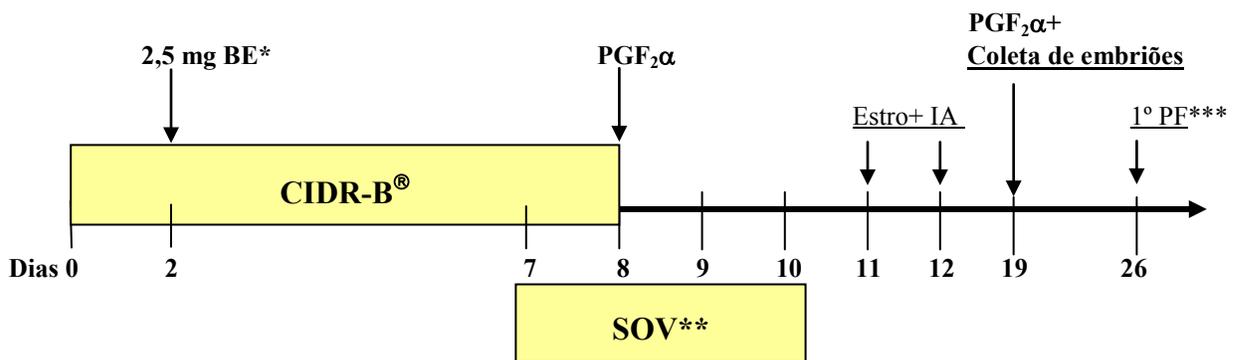


Figura 1. Protocolo de superovulação e PF utilizado nas vacas do grupo corpos lúteos.

* Benzoato de estradiol (Estrogin; Farmavet).

**Superovulação utilizando Pluset (250UI), 2 aplicações/ dia em doses decrescentes.

***1º Punção folicular. As demais punções foram realizadas a cada 7 dias, totalizando 5 sessões de punção folicular.

Para realização das PFs, as vacas receberam previamente anestesia epidural baixa, 5 a 7mL de anestésico local (lidocaína 2%). O método de aspiração folicular utilizado no experimento foi adaptado de Petyim et al. (Petyim et al., 2003). A PF foi realizada via transvaginal, com aparelho de ultrassonografia (Aloka 500 com transdutor setorial de 5 MHz, Tóquio, Japão), adaptado a um sistema de agulhas descartáveis (agulha para aspiração folicular, Handle Cook[®]), com 18 g° de diâmetro, acoplado a um sistema de vácuo (bomba para aspirações foliculares, Handle Cook[®]), com pressão de aspiração correspondendo a aproximadamente -75 a -85 mmHg. Foram punccionados todos os folículos que possuíam diâmetro acima de 3mm.

Os ovócitos aspirados foram retidos em tubo Falcon de 50mL (Corning[®], New York, USA), sendo que o

meio de lavagem utilizado para PF foi Dulbecco PBS, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), gentamicina e heparina 100UI/mL. O material coletado das PFs foi filtrado (filtro Milipore® para embrião) e lavado com PBS para facilitar o rastreamento.

O rastreamento dos complexo *cumulus*-ovócitos (CCOs) foi realizado em placa de petri utilizand-se o lupa estereomicroscópica (OlympusSZX7®, Pensilvania, USA), em aumento de 40X, para avaliação morfológica de sua qualidade. Os CCOs foram classificados em quatro categorias de acordo com a classificação proposta por Leibfried and First (1979). Os ovócitos classificados nas categorias I e II foram considerados como de boa qualidade, e os das categorias III e IV como de má qualidade.

O modelo estatístico incluiu o efeito animal, a condição corporal (CC), a coleta, o tratamento e suas interações. Não foram detectados efeito de animal, CC, coleta e suas interações, sendo que estes efeitos foram excluídos do modelo estatístico final. As variáveis dependentes binomiais, tais como: taxa de recuperação ovocitária e porcentagem de ovócitos de qualidade I e II e de qualidade III e IV, foram analisadas pelo teste do qui-quadrado.

Resultados e Discussão

A taxa de recuperação ovocitária e a qualidade dos ovócitos recuperados estão apresentadas na Tab. 1. O GCL apresentou melhor qualidade ovocitária do que o GC. Apesar de não ter havido diferença entre os grupos em relação ao número de ovócitos coletados, o GCL apresentou maior proporção de ovócitos de boa qualidade que o GC (28,6 e 6,4%, respectivamente; $P < 0,001$). Como esperado, as vacas do GCL demonstraram, em média, $3,05 \pm 1,86$ CL detectados no momento da primeira punção folicular, sete dias após a coleta de embriões, enquanto as vacas do GC apresentaram, em média, $0,75 \pm 0,3$ CL. Embora a concentração plasmática de progesterona não tenha sido analisada, estudos demonstraram que o número de CLs está diretamente relacionado com o aumento da concentração plasmática de progesterona (Baruselli et al., 2001; Bo et al., 2002; Ferreira et al., 2006). Desta forma, os resultados do presente experimento podem estar associados ao aumento de progesterona plasmática no GCL, devido à presença de múltiplos CLs. Tais CLs podem ser consequentes da luteólise parcial ocorrida devido à administração de apenas uma dose de prostaglandina no dia da coleta de embriões. A progesterona permite que o folículo seja exposto por um maior período a pulsos de LH de baixa amplitude, obtendo um ovócito de melhor qualidade (Greve et al., 1995; Pfeifer et al., 2009). Contrariamente, de Wit et al. (2000) não registraram diferença na qualidade e no número de ovócitos de ovários de abatedouros coletados em fase folicular, luteal precoce e luteal tardia. Além do possível efeito dos CLs sobre a qualidade dos ovócitos, o tratamento superovulatório realizado no GCL, previamente às PFs, pode ter resultado em efeito positivo na qualidade dos ovócitos inclusos em folículos pré-antrais sensíveis a gonadotrofinas. Estudos evidenciando o efeito das gonadotropinas sobre folículos pré-antrais já foram demonstrados (para revisão: Fortune, 2003). O tratamento superovulatório com gonadotrofinas (FSH:LH) pode ter afetado a qualidade de ovócitos, pois ovócitos inclusos em folículos pré-antrais presentes no ovário no momento da superovulação somente foram obtidos nas PFs subsequentes. Em um estudo recente, Vianna et al. (2010) registraram que vacas em fase aleatória do ciclo estral, submetidas a repetidas seções de aspiração folicular, mantiveram a concentração plasmática de progesterona de $<1\text{ng/mL}$. Surpreendentemente, não foram encontrados na literatura registros que comparam a eficiência de diferentes protocolos de indução de luteólise dos CLs formados após a superovulação. No presente trabalho, foram detectados vários CLs após a injeção de somente uma dose de PGF2 α , no dia 7 após a ovulação. A habilidade da PGF2 α em causar luteólise, no período de luteinização recente, ainda não foi totalmente elucidada (Levy et al., 2000). Além disso, a presença de CLs após a aplicação de PGF2 α em vacas submetidas à SOV e à coleta de embriões já foi descrita (Castilho et al., 2009). Estes resultados podem ter sido consequentes da aplicação de somente uma única dose de prostaglandina, sendo esta insuficiente para causar luteólise completa. Além disso, o fato de que as ovulações em vacas superovuladas podem ocorrer em um intervalo de 24-36 horas indica que alguns CLs poderiam ter em torno de 5,5 - 6 dias no momento da aplicação de PGF2 α , período em que o poder luteolítico da prostaglandina é reduzido (Thatcher et al., 2001). Portanto, um maior número de aplicações de PGF2 α , nos dias subsequentes após a coleta dos embriões, pode ser interessante para se obter uma luteólise completa dos CLs.

Foi observado que os CLs do GCL permaneceram durante todo o período experimental. A persistência dos CLs se deve ao fato de que o estradiol (E2) circulante tem ação importante na cascata fisiológica envolvida na luteólise (Salfen et al., 1999; Araujo et al., 2009). A destruição (Ginther, 1971) ou a punção dos folículos ovarianos (Araujo et al., 2009) atrasam a luteólise devido à redução da concentração de estradiol. A ativação dos receptores de oxitocina no útero pelo estradiol circulante é essencial para a síntese e secreção de prostaglandina (Silvia et al., 1991; Mann et al., 2001; Araujo et al., 2009). As punções foliculares seriadas, juntamente com a aplicação de PGF2 α no momento da coleta dos embriões, podem estar ligadas à permanência dos CLs.

A obtenção de ovócitos pós-coleta de embriões, caso sejam submetidos à fecundação *in vitro*, pode maximizar o aproveitamento de um programa de transferência de embriões. Este procedimento se torna interessante

ao passo que muitas vezes a transferência de embriões não demonstra resultados satisfatórios, sendo que os custos com hormônio, alimentação, obtenção de doadoras e receptoras, sêmen, material para coleta e transferência e encargos veterinários se tornam onerosos quando os resultados não são satisfatórios. Neste caso, a punção folicular pós-superovulação pode ser uma alternativa viável, pois há a possibilidade de incremento da produção de embriões no intervalo entre superovulações.

Os resultados deste experimento demonstram que vacas submetidas à punção folicular seriada, após tratamento de superovulação, apresentam aumento na qualidade dos ovócitos coletados.

Tabela 1. Classificação de ovócitos quanto à qualidade de vacas coletadas em fase aleatória do ciclo estral (grupo-controle) e vacas com mais de um CL durante as sessões de PF (grupo CL).

	Grupo-controle	Grupo CL	Valor de P
Taxa de recuperação ovocitária (n)	70.9% (202/285)	69.2% (287/415)	0.6
Ovócitos de qualidade I e II (n)*	6.4% (13)	28.6% (82)	<0.001
Ovócitos de qualidade III e IV*	93.6% (189)	71.4% (205)	<0.001

*I, II, III e IV: qualificação dos ovócitos de acordo com a qualidade, sendo I e II considerados qualidade boa, e III e IV considerados qualidade ruim.

Referências bibliográficas

- Araujo RR, Ginther OJ, Ferreira JC, Palhao MM, Beg MA, Wiltbank MC.** Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. *Biol Reprod*, v.81, p.426-437, 2009.
- Baruselli PS, Marques MO, Madureira EH, Costa Neto WP, Grandinetti RR, Bo GA.** Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices and eCG. *Theriogenology*, v.55, p.157, 2001. (abstract).
- Blondin P, Coenen K, Guilbault LA, Sirard MA.** In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology*, v.47, p.1061-1075, 1997.
- Bo GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ.** The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, v.57, p.53-72, 2002.
- Bols PE, Ysebaert MT, Van Soom A, de Kruif A.** Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology*, v.47, p.1221-1236, 1997.
- Bousquet D, Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Carboneau G, Durocher J.** In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*, v.51, p.59-70, 1999.
- Castilho C, Renesto A, Mustafá FC, Silva JOF, Coelho LA, Garcia JM.** Associação da moet e opu-piv na produção de embriões bovinos. *Ciênc Anim Bras*, v.10, p.231-237, 2009.
- de Wit AA, Wurth YA, Kruip TA.** Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J Anim Sci*, v.78, p.1277-1283, 2000.
- Fortune JE.** The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.135-163, 2003.
- Ferreira RM, Rodrigues CA, Ayres H, Mancilha RF, Franceschini PH, Esper CR, Baruselli PS.** Effect of synchronizing ovulation in cattle administered a norgestomet ear implant in association with eCG and estradiol treatments on pregnancy rate after fixed-time embryo transfer. *Anim Reprod*, v.3, p.370-375, 2006.
- Ginther OJ.** Response of corpora lutea to cauterization of follicles in sheep. *Am J Vet Res*, v.32, p.59-62, 1971.
- Greve T, Hyttel P, Assey R.** The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology*, v.43, p.41-50, 1995.
- Hagemann LJ, Beaumont SE, Berg M, Donnison MJ, Ledgard A, Peterson AJ, Schurmann A, Tervit HR.** Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol Reprod Dev*, v.53, p.451-458, 1999.
- Havlicek V, Kuzmany A, Cseh S, Brem G, Besenfelder U.** The effect of long-term in vivo culture in bovine oviduct and uterus on the development and cryo-tolerance of in vitro produced bovine embryos. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.832-837, 2010.
- Hendriksen PJ, Steenweg WN, Harkema JC, Merton JS, Bevers MM, Vos PL, Dieleman SJ.** Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.61, p.909-920, 2004.
- Leibfried-Rutledge ML, First NL.** Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro.



J Anim Sci, v.48:76-86, 1979.

Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, Northey DL, First NL. Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biol Reprod*, v.36, p.376-383, 1987.

Levy N, Kobayashi S, Roth Z, Wolfenson D, Miyamoto A, Meidan R. Administration of prostaglandin f(2 alpha) during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and of its type A receptor: a possible cause for corpus luteum refractoriness. *Biol Reprod*, v.63:377-382, 2000.

Machatkova M, Jokesova E, Petelikova J, Dvoracek V. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, v.45, p.801-810, 1996.

Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology*, v.61, p.329-335, 2004.

Mann GE, Payne JH, Lamming GE. Hormonal regulation of oxytocin-induced prostaglandin F(2alpha) secretion by the bovine and ovine uterus in vivo. *Domest Anim Endocrinol*, v.21, p.127-141, 2001.

Petyim S, Bage R, Hallap T, Bergqvist AS, Rodriguez-Martinez H, Larsson B. Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function. *Theriogenology*, v.60, p.175-188, 2003.

Pfeifer LFM, Sartori R, Pivato I, Rumpf R, Nogueira GP, Xavier E, Dionello NJ, Correa MN. Effect of circulating progesterone on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Anim Reprod*, v.6, p.473-478, 2009.

Salamone DF, Adams GP, Mapletoft RJ. Changes in the cumulus-oocyte complex of subordinate follicles relative to follicular wave status in cattle. *Theriogenology*, v.52, p.549-561, 1999.

Salfen BE, Cresswell JR, Xu ZZ, Bao B, Garverick HA. Effects of the presence of a dominant follicle and exogenous oestradiol on the duration of the luteal phase of the bovine oestrous cycle. *J Reprod Fertil*, v.115, p.15-21, 1999.

Silvia WJ, Lewis GS, McCracken JA, Thatcher WW, Wilson Jr. L. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F2 alpha during luteolysis in ruminants. *Biol Reprod*, v.45, p.655-663, 1991.

Thatcher WW, Moreira F, Santos JE, Mattos RC, Lopes FL, Pancarci SM, Risco CA. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*, v.55, p.75-89, 2001.

Viana JH, Palhao MP, Siqueira LG, Fonseca JF, Camargo LS. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology*, v.73, p.966-972, 2010.
