



EFEITO DA SUPEROVULAÇÃO NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES IN VITRO EM VACAS DA RAÇA NELORE

Carina Cavichioli¹; Fábio Luiz Bim Cavalieri²; Antonio Hugo Bezerra Colombo³; Karina Volpe Oliveira⁴

RESUMO: A técnica de superovulação é um dos passos fundamentais no programa de transferência de embriões em bovinos. Tem como objetivo estimular, através de administração de hormônios, o desenvolvimento de um grande número de folículos até o estágio no qual possam ovular. Objetiva-se avaliar a possível relação dos efeitos da superovulação da produção de embriões IN VITRO em vacas da raça Nelore. O experimento será realizado na fazenda experimental do Unicesumar, e serão utilizadas 15 vacas da raça Nelore dividida em dois tratamentos com 07 (sete) repetições cada. No primeiro tratamento os ovários serão aspirados em dias aleatórios do ciclo estral e no segundo tratamento os animais serão superovulados com FSH (Pluset¹) durante 04 dias e 24 horas após a última aplicação, onde os mesmos serão aspirados com o auxílio de um ultrassom ALOKA SSD500 e probe de 5,0 MHZ. Após a aspiração os ovócitos serão conduzidos ao laboratório onde os mesmos serão maturados, fertilizados e cultivados in vitro. Ao final da pesquisa espera-se aumentar a produção de embriões produzidos in vitro, superovulando as doadoras antes da aspiração folicular.

PALAVRAS-CHAVE: Embrião; FIV; Nelore; Superovulação.

1 INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira é de importância fundamental para o desenvolvimento da economia do país. Suas atribuições incluem, desde o fornecimento de alimentos para a população, bem como a geração de emprego e renda (BRASIL, 2015). O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo e coloca-se como segundo maior produtor e o primeiro exportador no ranking mundial de carne bovina (CONAB, 2015). Uma das grandes vantagens da aspiração folicular em bovinos e a posterior produção in vitro de embriões se encontra no fato da técnica ser aplicada sem a necessidade de qualquer aplicação de hormônios nas vacas doadoras, ou seja, em qualquer momento do ciclo estral pode se fazer aspiração folicular, isto é interessante, pois não existe a necessidade de conduzir os animais várias vezes aos bretes de contenção, diminuindo assim o stress causado aos animais. Uma das possíveis explicações para o efeito da pré-estimulação ovariana com FSH na taxa de blastocisto, seria um aumento no número de folículos médios e grandes impedindo os mesmos de entrarem em atresia, estes oócitos estariam mais capacitados para sofrerem a maturação in vitro (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Como resultado, a PIVE vem obtendo avanços consideráveis nos últimos anos e está sendo amplamente incorporada a projetos de reprodução (PONTES et al., 2010).

Temos por objetivo com a conclusão da pesquisa aumentar a produção de embriões in vitro, objetivando avaliar o efeito da superovulação das doadoras de oócitos com FSH, previamente a aspiração folicular em vacas da raça Nelore.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento será realizado no Centro de Biotecnologia da Reprodução – BIOTEC. Onde serão avaliados a produção de oócitos e embriões de vacas Nelore produzidos in vitro, superestimuladas com 200 UI de FSH (Hormônio Folículo Estimulante – Pluset¹). Serão utilizadas 14 fêmeas adultas da raça Nelore proveniente do mesmo grupo genético, com idade entre 4 a 9 anos, com peso médio de 420 Kg de peso vivo, distribuídas aleatoriamente em dois grupos:

- Grupo controle (n=7): Aspiração em dias aleatórios do ciclo estral,

- Grupo FSH (n=7): Os animais serão superovulados com FSH (Pluset¹) durante 04 dias e 24 horas após a última aplicação os mesmos serão aspirados.

As aspirações foliculares serão realizadas com o auxílio de um ultrason ALOKA SSD500 e probe de 5,0 MHZ. Como critério de avaliação, os oócitos serão classificados de acordo com a sua morfologia (número de camadas e o grau de expansão das células do *cumulus* e o aspecto do citoplasma quanto à cor, homogeneidade e integridade) em grau I, II, III e IV. Serão selecionados para esta pesquisa, somente os complexos *cumulus* oócitos

¹ Centro Universitário Cesumar – UniCesumar – Maringá, PR



viáveis, ou seja, aqueles que apresentaram, no mínimo, três camadas de células do *cumulus* compactas e o citoplasma homogêneo.

Após a seleção, os complexos *cumulus* oócitos serão maturados *in vitro* em placas de maturação, em meio TCM199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO_3 , suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 22 $\mu\text{g/mL}$ piruvato, 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina, 0,5 μg de FSH/mL, 50 μg de LH/mL e 1 μg de estradiol/ml, mantidos em estufa a 39°C, em atmosfera com 5% de CO_2 em ar, com umidade máxima, durante 22 a 24 horas.

Na sequência, os oócitos serão colocados em uma placa contendo 21 microgotas de 75 μL de meio de maturação, com 10 oócitos por microgota, cobertas por óleo mineral. A fecundação será realizada em gotas de 75 μl de meio TALP suplementado com 10 $\mu\text{g/mL}$ de heparina, 22 $\mu\text{l/mL}$ de piruvato, 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina, albumina sérica bovina-BSA (sem ácidos graxos), solução de PHE (2 μM de penicilina, 1 μM de hipotaurina e 0,25 μM de epinefrina). O sêmen utilizado será de um touro da raça nelore e o sêmen será descongelado, em banho-maria a 35°C, por 30 segundos. Para seleção dos espermatozoides móveis e remoção de diluidores e do plasma seminal, será realizada centrifugação em gradiente percoll (90 e 45%), durante 9 minutos. A concentração espermática empregada foi de 1×10^6 espermatozoides/mL e, após a fecundação, os oócitos serão transferidos para as microgotas (10 oócitos/gota), onde permanecerão por 24 horas, a 38,5°C, em atmosfera com 5% de CO_2 em ar.

Após a fertilização, os zigotos serão cultivados *in vitro*, no meio SOF (*Synthetic Oviduct Fluid*), suplementado com SFB (Soro Fetal Bovino), com monocamada de células da granulosa. O cultivo será realizado por 24 horas após a inseminação, em incubadora, com atmosfera gasosa controlada contendo 5% CO_2 , 5% de O_2 e 90% de N_2 . No dia 4 (D4) será realizado a renovação do meio de cultivo.

Os embriões do serão mantidos na estufa até o 7º dia de cultivo, quando se avaliará a taxa de blastocisto no dia 7 (D7) e, posteriormente, no dia 9 (D9), a taxa de blastocistos eclodidos.

O delineamento experimental será inteiramente casualizado, com 3 tratamentos e cinco repetições cada. As características estudadas serão: número de oócitos viáveis, taxa de blastocisto e taxa de blastocistos eclodidos. O programa estatístico utilizado para a realização das análises será o SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM), utilizando-se o procedimento "Proc Genmod" e distribuição binomial.

3 RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se com esta pesquisa AUMENTAR a produção de embriões produzidos *in vitro*, superovulando as doadoras antes da aspiração folicular.

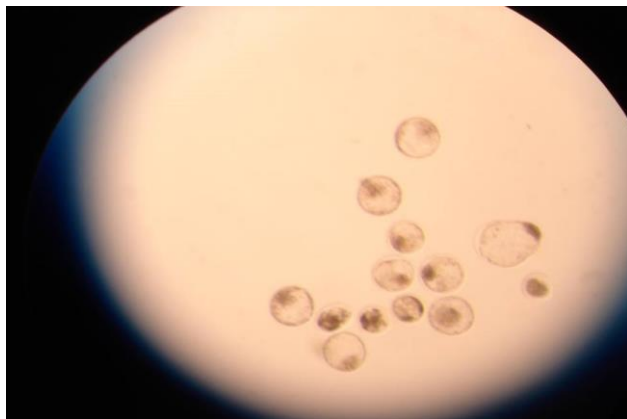


Figura 1 – Embriões Produzidos *In Vitro*

Fonte: Disponível em: WWW.facebook.com.

Acesso em: 17.Ago.2015



Figura 2 – Bezerros Produzidos *In Vitro*

Fonte: Disponível em: WWW.facebook.com

Acesso em: 17.Ago.2015

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil. Assessoria de Gestão Estratégica (Org.). Projeções do Agronegócio, Brasil 2012/13 a 2022/23. Brasília, 2013. Disponível em <[http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%20Agronegocio%20Brasil%202011-20012%20a%202021-2022%20\(2\)\(1\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%20Agronegocio%20Brasil%202011-20012%20a%202021-2022%20(2)(1).pdf)>. Acessado em 26/03/2015.

CONAB – Companhia Nacional de Abatecimento. Indicadores da Agropecuária: Quadro de Suprimentos. Disponível em < <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1538&t=2> >. Acessado em 14/03/2015.



GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª. ed, São Paulo, SP: Roca, 2008. 395p.

PONTES, J.H.F. **Aspectos aplicados da produção in vitro de embriões bos indicus**.

S

AS INSTITUTE INC., **Statistical Analysis System**, Versão 8.0. Cary, NC: 2000. (Manual On-line).