



IV ENCONTRO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL:

AVANÇOS E TENDÊNCIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA SAÚDE HUMANA E ANIMAL

AVALIAÇÃO DA TAXA DE FERTILIZAÇÃO PARA O ESTABELECIMENTO DE UM PROGRAMA DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DA ESPÉCIE OVINA

Rômulo José Vieira⁴; Letícia Soares de Araújo Teixeira²; Francisca Kelly dos Santos Silva³;
Jefferson Ribeiro Bezerra³; André Luiz Nogueira de Medeiros³;
Cristiane Clemente de Mello Salgueiro⁴; Janaina de Fátima Saraiva Cardoso^{1,4};
José Ferreira Nunes⁴; Ney Rômulo de Oliveira Paula^{1,4}

¹Docente do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Teresina-PI; ²Pós-graduanda em Reprodução Animal, Programa de Pós-graduação em Zootecnia Tropical, Teresina-PI; ³Pós-graduanda em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Teresina-PI; ⁴Docente do Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Fortaleza-CE/Teresina-PI.
rvieirasb@yahoo.com.br

RESUMO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma biotecnologia de reprodução assistida relevante, uma vez que pode ser utilizada com a finalidade de superar as limitações encontradas na reprodução da espécie ovina e otimizar o ganho genético nessa espécie. Nesse contexto, objetivou-se avaliar a taxa de fertilização *in vitro* na espécie ovina, com o intuito de aprimorar e estabelecer essa rotina na etapa da produção *in vitro* de embriões ovinos, em um laboratório no estado do Piauí. Para tanto, ovários de abatedouros foram colhidos e manipulados em laboratório, visando a obtenção dos complexos *cumulus* oócitos (CCO's), por meio de aspiração folicular e fatiamento (*slicing*) dos ovários. Em seguida, essas estruturas foram selecionadas, classificadas e submetidas ao processo de maturação *in vitro*. Posteriormente, os CCO's maturados foram submetidos ao co-cultivo com células espermáticas (fertilização *in vitro*). Após o período de fertilização *in vitro*, os presumíveis zigotos foram avaliados, buscando a identificação das primeiras clivagens ou segmentações. De um total de 400 CCO's submetidos a maturação *in vitro*, 370 CCO's (92,5%) maturaram e 270 (73%) estruturas apresentaram clivagem após fertilização *in vitro*. Dessa forma, salienta-se que essa biotecnologia, aplicada a espécie ovina, é viável e apresenta resultados promissores.

PALAVRAS-CHAVES: Fertilização *in vitro*; Clivagem; Ovino.

1 INTRODUÇÃO

O nordeste brasileiro é caracterizado como uma região vocacionada para desenvolver atividades econômicas envolvendo a espécie ovina, devido principalmente à adaptabilidade desta espécie às condições edafoclimáticas da região. Dessa forma, a ovinocultura é apontada como uma das atividades mais apropriadas para o nordeste (SOUSA, 2016).

Atualmente, com o crescimento do rebanho ovino no Brasil, pesquisas na área de biotécnicas aplicadas à reprodução assistida, como a produção *in vitro* de embriões (PIV) têm recebido destaque, uma vez que proporciona aumento significativo no número de animais com genética selecionada e de alto mérito zootécnico, auxiliando o melhoramento genético desses rebanhos no Brasil (BOGLIOLO et al., 2007; CARVALHO et al., 2011).

Para a realização da fecundação *in vitro* (FIV), pode-se utilizar sêmen fresco ou congelado. No entanto, o sêmen congelado tem se tornado o mais usual na rotina, devido à facilidade de aquisição e manipulação. Ademais, vale salientar que essa etapa da produção *in vitro* de embriões ovinos é a mais laboriosa, detalhista e requer muita atenção e aprimoramento da equipe que a executa. Isso vai desde a preparação dos meios de fertilização e seleção espermática (gradiente de *Percoll*), pois para o sucesso dessa etapa é indispensável o uso de soro de ovelha em estro, o qual não é comercializado, portanto, deve ser obtido por meio de protocolos hormonais, visando a indução do cio e posterior obtenção do sangue e soro (ROCHA-FRIGONI et al., 2014; ROMÃO et al., 2013).

Apesar das dificuldades, a produção *in vitro* de embriões (PIV) ovinos, já tem avançado consideravelmente quanto a pesquisas científicas, e vem se tornando uma biotécnica reprodutiva ascendente, uma vez que possibilita o aumento de rebanhos com raças geneticamente privilegiadas e viabiliza o melhoramento genético (BEZERRA et al., 2014). Além disso, essa biotecnologia pode minimizar problemas como: baixas taxas de fecundação, ocorrência de regressão prematura do corpo lúteo e altos custos relativos a procedimentos cirúrgicos para a colheita e transferência de embriões (BALDASSARRE e KARATZAS, 2004).

2 OBJETIVO

Tendo em vista os benefícios da produção *in vitro* de embriões e a necessidade de otimização dessa biotecnologia aplicada à espécie ovina, objetivou-se, por meio deste estudo, avaliar a taxa de fertilização *in vitro* na produção *in vitro* de embriões ovinos, para o estabelecimento da rotina em laboratório no estado do Piauí.

3 MATERIAIS E MÉTODO

Os ovários de ovelhas foram colhidos em abatedouros localizados no município de Teresina, PI. Na colheita obteve-se um total de 60 ovários oriundos de 30 ovelhas púberes sem padrão racial definido. Ao chegar no laboratório (Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal/CCA/UFPI) os ovários foram manipulados, visando a obtenção dos complexos *cumulus* oócitos (CCO's) pelas técnicas de aspiração folicular e fatiamento ovariano (*slicing*). Os CCO's obtidos foram classificados quanto ao grau de qualidade morfológica (grau I, II, III e IV) e

selecionados para a etapa de maturação *in vitro* (MIV). A maturação *in vitro* ocorreu em meio de MIV contendo TCM 199 suplementado com piruvato, bicarbonato, FSH, LH, estradiol (E2) e 10% de soro fetal bovino em incubadora com atmosfera e umidade controladas a 38,5 °C, com 5% de CO₂ medicinal (grau USP), durante 24 horas.

Ao término da etapa de maturação *in vitro*, procedeu-se a avaliação dos CCO's quanto a extrusão do primeiro corpúsculo polar, evidenciando a retomada da meiose I, início da meiose II e parada na fase de metáfase II. Nesse estágio nuclear o complexo *cumulus* oócitos está apto a ser fertilizado.

Seguidamente, os CCO's maturados (apresentando extrusão do primeiro corpúsculo polar) foram submetidos a etapa de fertilização *in vitro* (FIV) no co-cultivo com células espermáticas. A fertilização foi realizada, utilizando sêmen congelado/descongelado, o qual foi previamente centrifugado em meio *Percoll* para separação dos espermatozoides viáveis. Em seguida, foi realizada a inseminação das gostas de meio FIV contendo os CCO's maturados. A fertilização *in vitro* ocorreu em meio específico de FIV suplementado com SOF, bicarbonato, 10% de soro de ovelha em estro, Tyrode's (TALP), hipotaurina e glutatona em incubadora com atmosfera e umidade controladas a 38,5 °C, com 5% de CO₂, durante 18 horas.

Ulteriormente, os presumíveis zigotos foram avaliados para identificação das primeiras clivagens ou segmentações em estereomicroscópio no aumento de 40x.

Os resultados foram expressos na forma de percentual.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 400 complexos *cumulus* oócitos (CCO's) submetidos a etapa de maturação *in vitro* (MIV), 370 (92,5%) maturaram, evidenciado pela apresentação da extrusão do primeiro corpúsculo polar e expansão das células do *cumulus*. Desse total de oócitos, 270 (73%) iniciaram o processo de clivagem (apresentando dois blastômeros), o que demonstra ocorrência satisfatória da etapa de fertilização *in vitro* e 100 (27%) oócitos não apresentaram sinais de início de clivagem.

Vários avanços têm sido alcançados na PIV de embriões ovinos, e os resultados obtidos neste estudo, testificam que apesar das dificuldades na execução dessa biotecnologia reprodutiva, particularmente na espécie ovina, os resultados são promissores (ROCHA-FRIGONI et al., 2014).

De acordo com Rocha-Frigoni et al. (2014), apesar dos avanços na PIV de embriões ovinos as taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* ainda são significativamente inferiores, quando comparadas à situação *in vivo*, o que pode ser atribuído a deficiências nas maturações nuclear e citoplasmática *in vitro*, impedindo a ocorrência da fertilização *in vitro* e conseqüentemente não havendo desenvolvimento embrionário. Fato este que explica a possível causa da não clivagem de 100 (27%) oócitos após fertilização *in vitro*.

Todavia a taxa de fertilização *in vitro* (FIV) confirmada pela presença de clivagens, neste estudo, foi satisfatória, totalizando 73% de oócitos clivados. E segundo Bernadi (2005) o acréscimo de soro de ovelha em estro (SOE) na concentração de 10% em meio de fertilização *in vitro*, resulta em aumento significativo da taxa de clivagem. Corroborando com os resultados encontrados nesta pesquisa, pois foi adicionado ao meio de FIV 10% de SOE.

5 CONCLUSÕES

A biotecnologia de produção *in vitro* de embriões ovinos é plenamente viável e vem apresentando resultados promissores. Uma das etapas críticas dessa biotécnica é a fertilização *in vitro*, na qual há muitas variáveis que precisam ser controladas, entretanto, com o avanço nos estudos e pesquisas, essa etapa vem sendo aperfeiçoada de modo que o desenvolvimento embrionário subsequente é possível. Adicionalmente, a rotina prática de programa de produção de embriões ovinos *in vitro* foi estabelecida pela primeira vez em laboratório no estado do Piauí.

REFERÊNCIAS

- BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C.N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction Science*, Dublin, v. 82, n. 83, p. 255-266, 2004.
- BERNADI, M. L. Produção *in vitro* de embriões ovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*. Porto Alegre, v. 33, n. 1, p. 1-16, 2005.
- BEZERRA, F. Q. G.; SILVA, J. C. F.; SILVA, P. G. C.; CANTANHÊDE, L. F.; BASTO, S. R. L.; FREITAS NETO, L. M.; MOURA, M. T.; LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A. L. Produção *in vitro* de embriões ovinos a partir de oócitos coletados durante os períodos seco e chuvoso. *Revista de Medicina Veterinária*, Recife, v. 8, n. 3, p. 17-23, 2014.
- BOGLIOLO, L.; ARIU, F.; FOIS, S.; ROSATI, I.; ZEDDA, M.T.; LEONI, G.; SUCCU, S.; PAU, S.; LEDDA, S. Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without *cumulus* cells. *Theriogenology*, v. 68, n.8, p.1138-1149, 2007.
- CARVALHO, A.A.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, A.P.R. Vitrificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.5, n.3, p.236-248, 2011.
- ROCHA-FRIGONI, N.A.S.; LEÃO, B.C.S.; FELICIANO, M.A.R.; VICENTE, W.R.R.; OLIVEIRA, M.E.F. Produção *in vitro* de embriões ovinos: avanços e desafios. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 38, n. 2, p. 103-109, 2014.
- ROMÃO, R; MARQUES, C.C.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; BARBAS, J.P.; HORTA, A.E.M.; CAROLINO, N.; BETTENCOURT, E.; PLANCHA, C.; RODRIGUES, P.; PEREIRA, R.M. Evaluation of two methods of *in vitro* production of ovine embryos using fresh or cryopreserved sêmen. *Small Rumin Res* 2013; 110: 36-41.

SOUSA, M.S. Sincronização do estro e inseminação artificial de ovelhas utilizando água de coco em pó. 2016. 39f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2016.