Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

Fotoperíodo artificial na produção de oócitos e no desenvolvimento embrionário em caprinos

Artificial photoperiod in oocytes production and embryonic development on goats

Antônio Carlos Duenhas Monreal[1], Gilson Helio Toniollo[2], Joaquim Mansano Garcia[2], Marcos Chalhoub[3], Antonio de Lisboa Ribeiro Filho[3], Silvana Marques Caramalac[1], Simone Marques Caramalac[1]

[1] Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Cidade Universitária, Laboratório BIOCAPRI, Avenida Senador Filinto Muller, 2430A, Campo Grande, MS, CEP: 79070-900. E-mail: antonio.monreal@ufms.br
[2] Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Campus Jaboticabal , Faculdade de Ciências Agrárias Veterinárias (FCAV), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Jaboticabal, SP
[3] Universidade Federal da Bahia (UFBA), Departamento de Patologia e Clínicas, Salvador, BA

Recebido em: 18/04/2013 Aceito em: 07/09/2013

Resumo. Para se alcançar maiores índices reprodutivos em cabras, o fotoperíodo artificial tem sido usado apenas na sincronização de estro. Além disso, esta espécie animal tem importância na produção de animais transgênicos produzidos por FIV. O objetivo deste estudo foi produzir e comparar embriões caprinos (*Capra hircus*-Linnaeus-1758) provenientes de cabras Alpinas submetidas ao fotoperíodo natural (estação e anestro) e artificial (120 luxes/45 dias/20 h). Foram utilizadas 31 cabras Alpinas, distribuídas em cinco grupos, avaliando o fotoperíodo natural e artificial, utilizando sêmen fresco e congelado e heparina (200µg mL^{-1}) na capacitação espermática. Foram obtidos 720 oócitos e sete blastocistos (cinco do G3- fotoperíodo natural e dois no G2 –fotoperíodo artificial, ambos durante o anestro estacional). Estes foram congelados por um ano. Ao término do estudo concluiu-se que não houve diferença estatística entre os grupos. Após a descongelação e transferência de sete embriões, obteve-se o primeiro produto FIV caprino do Brasil proveniente de embrião congelado produzido em fotoperíodo artificial.

Palavras-chave. Cabras, fertilização, fotoperíodo, oócitos, superovulação

Abstract. To achieve greater reproductive indices in goats, the artificial photoperiod has only been used in estrus synchronization. In addition, this animal species is important in the production of transgenic animals produced pro IVF. The aim of this study was to produce and compare embryos goats (*Capra hircus*-Linnaeus-1758) from Alpine goats subjected to natural photoperiod (season and anestrus) and artificial (120 luxes/45 dias/20 h). 31 Alpine goats were used, divided into five groups, evaluating the natural and artificial photoperiod, using fresh and frozen semen and heparin (200µg/ mL^{-1}) in sperm capacitation. 720 oocytes were obtained and seven blastocysts (five natural photoperiod-G3 and G2-two in artificial photoperiod, both during seasonal anoestrus). These were frozen for a year. At the end of the study concluded that there was no statistical difference between groups. After thawing and seven embryo transfer, was obtained the first goat IVF of Brazil from the frozen embryo produced by artificial photoperiod.

Keywords. Goats, fertilization, photoperiod, oocytes, superovulation

Introdução

Segundo dados da FAO (2012) o Brasil ocupa a décima sétima posição mundial em população caprina, sendo o Nordeste a região que abriga 91% deste contingente (IBGE, 2012). Mesmo assim, a produção brasileira de carne, leite e derivados dessa espécie é baixa, merecendo uma política de atenção para as pequenas propriedades rurais.

Essencialmente, a reprodução bem assistida e com qualidade favorece a expansão do setor, sendo a biotecnologia uma ferramenta de auxílio a essa atividade. Uma das técnicas utilizadas é a fertilização *in vitro*, que consiste na união dos

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

gametas masculino e feminino em laboratório visando aumentar a produção de embriões com maior valor genético e com menor custo. A produção *in vitro* oferece grandes vantagens como: mínima quantidade de hormônio necessária, possibilidade de realização da técnica em qualquer época do ano, fecundação da doadora com diferentes reprodutores e frequência mensal de aspiração das fêmeas doadoras (Lina & Santos, 2010). Além disso, serve como modelo para estudo de doenças em humanos (Baldassarre, 2012).

A obtenção do primeiro produto caprino pela fertilização *in vitro* foi conquistada por Hanada (1985), utilizando oócitos ovulados. Já Crozet et al. (1993), com a presença da maturação *"in vitro"*, obtiveram o primeiro produto caprino totalmente produzido em laboratório.

Outra ferramenta utilizada para otimizar a produção é o fotoperíodo artificial. Esse aumenta a taxa reprodutiva por levar a indução ao estro fora da estação reprodutiva. Entretanto, são poucos os estudos que o relacionam com o desenvolvimento e características dos oócitos e embriões. Bari et al. (2011) observaram que, em cabras da raça Black Bengal, a taxa de desenvolvimento folicular foi significativamente menor no verão, entretanto esta diferença foi relacionada ao estresse causado pelo calor, sem se saber ao certo a possível relação com o maior período de incidência solar dado nesta época do ano. Chaves et al. (2013) também relataram a influência ambiental no desenvolvimento de oócitos e produção *in vitro* de embriões caprinos, analisando o efeito das estações seca e chuvosa. Ao término do estudo concluíram que as fases iniciais do desenvolvimento embrionário sofrem maior impacto negativo durante a estação seca, em protocolos de Produção *In Vitro* (PIV), sendo que os embriões produzidos neste período apresentaram maior incidência de apoptose sem ainda causa conclusiva. Uma idéia inovadora é a partenogênese, uma técnica bem diferente da FIV, sendo uma alternativa viável na produção de fêmeas idênticas.

Pathak et al. (2013) utilizando oócitos maturados *in vitro,* comparando diferentes tratamentos concluíram que a ativação de oócitos maturados *in vitro* com 7% de etanol por 5 minutos seguidos por tratamento com 2mM DMPA nd 10 µg mL^{-1} de CHX por 4h em KSOM é o mais favorável à produção de embriões caprinos partenogenéticos, o que pode ser alternativa para a melhora da conquista de animais pela biotecnologia.

O objetivo do presente experimento foi produzir e comparar embriões caprinos provenientes de cabras alpinas submetidas ao fotoperíodo artificial e natural e promover a inovulação dos mesmos.

Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Setor de Caprinocultura e no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias Veterinária/Unesp-Jaboticabal (latitude 21°15'22''S, longitude 48°18'58'' e altitude de 595m). Foram utilizadas 31 cabras da raça Alpina, nulíparas e multíparas, durante o estro e anestro estacional (fevereiro-outubro/2002) e 15 cabras mestiças Anglonubianas como receptoras. As fêmeas foram previamente examinadas quanto ao estado clínico geral, e consideradas aptas quanto ao estado sanitário e reprodutivo. Os animais utilizados foram submetidos a um período pré-experimental de um mês, para adaptação à alimentação e à estabulação, sendo pesados e distribuídos nos grupos experimentais por sorteio. A alimentação consistiu de ração (14% de proteína bruta e 5,05% de fibra bruta) e feno de *Cynodon dactylon* ("Coast Cross") (4,98% de proteína bruta e 35,88% de fibra bruta, na matéria seca). Os animais receberam 0,5 kg cabeça^{-1} dia^{-1} de ração concentrada e 2 kg cabeça^{-1} dia^{-1} de feno, com disponibilidade *ad libitum* de mistura mineral e água.

Os animais foram ordenados em cinco grupos experimentais e estudados durante os seguintes períodos:

Período de Anestro Estacional

- (G2) Grupo com emprego do fotoperíodo artificial, n=5
- (G3) Grupo com fotoperíodo natural, n=5

Período da Estação Reprodutiva

- (G1) Grupo Controle com fotoperíodo natural, n=7.
- (G4) Grupo com fotoperíodo natural, n=7. Heparina (200µg mL^{-1}) na capacitação espermática.
- (G5) Grupo com fotoperíodo natural, n=7. Sêmen fresco na fertilização.

Os animais foram mantidos em boxes de três m^2, sob luminosidade natural até o início do fotoperíodo artificial para o G2.

Para aumentar a disponibilidade de folículos na aspiração (≥ 3 mm) os cinco grupos experimentais foram submetidos à impregnação prévia de progesterona exógena (CIDR-G-0,3g

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

Intervet® - Nova Zelândia) por 12 dias (retirados previamente à cirurgia), superestimulação ovariana com FSH-ov (Ovagen® ICP-Bio Immuno-Chemical Products Ltd-Nova Zelândia- partida 2182) (10 mg), em doses decrescentes nos dias 0, 10 e 11, divididos em intervalos de 12 h em volumes de (3, 2; 2, 1; 1; 1 mL), respectivamente. No dia 10 foi aplicado 125 µg de cloprostenol (Cooper do Brasil – partida 005/00), na estação reprodutiva.

As 15 receptoras foram sincronizadas durante nove dias com CIDR e cloprostenol e rufiadas com bodes após a retirada do dispositivo e inovuladas sete dias após. No dia da inovulação, foram escolhidas aleatoriamente as fêmeas que apresentaram melhores corpos lúteos, em tamanho (superiores a grão de feijão-seis mm, visualizados por laparoscopia) e coloração (vermelho intenso) para melhorar a implantação dos embriões.

O tratamento luminoso (fotoperíodo artificial) foi empregado apenas no G2, durante 45 dias, no período de anestro estacional, entre 15 de junho/2002 até 30 de julho/2002. Os animais ficaram em galpão apropriado no setor de caprinocultura da FCAV (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária)- Unesp - Jaboticabal, em baias conjuntas com 3,0 m^2 $animal^{-1}$. No galpão, as cinco cabras Alpinas receberam suplementação luminosa média de 120 luxes, composta de quatro lâmpadas fluorescentes de 40W, dispostas entre elas de 1,5 m com dois metros de altura. O grupo G2 (fotoperíodo artificial) recebeu o tratamento luminoso distante 600 metros dos outros grupos (G1, G3, G4 e G5). O período luminoso (claro) foi de 20 h diárias (natural- 11,26 h + artificial- 8,74 h), perfazendo as 20 h, de acordo com a técnica de Wilkinson & Stark (1987).

Os oócitos foram colhidos por laparotomia em duas épocas do ano. Em fevereiro/2002 as cabras do grupo G1, G4 e G5, em estro estacional, foram superovuladas e foram colhidos os oócitos. Em setembro/2002 foram colhidos os oócitos provenientes do grupo G2 (fotoperíodo artificial realizado anteriormente entre junho e julho/2002) e G3, cabras em anestro com fotoperíodo natural. Os oócitos das cabras foram colhidos no Hospital Veterinário da FCAV. Para isso, os animais foram submetidos ao jejum sólido e hídrico de 24 h e 12 h respectivamente. Após este jejum, foram pré-anestesiadas com sulfato de atropina (Ariston® Ind. Química e Farmacêutica Ltda-Brasil Lote 5693-partida 03/02 - 0,02mg por kg de peso corporal IM), e anestesiadas 15 minutos após por punção da veia jugular com Cloridrato de Xilazina (Bayer do Brasil-partida 004/01 - 0,2mg por kg de peso corporal) e Cloridrato de Quetamina (Holliday® Ind. Argentina, Scott S/A, Argentina - 2-3mg por kg de peso corporal) na mesma seringa. O mesmo procedimento pré - anestésico foi utilizado para as receptoras.

Após tricotomia da região abdominal foi efetuada antissepsia com iodo e abertura do abdômen, cinco centímetros cranialmente à glândula mamária. Após exposição dos ovários, iniciou-se a aspiração folicular com scalp 19 G (Figura 1), acoplados a seringa de 20 mL contendo 5 mL de PBS suplementado com 10 unidades de heparina por mL.

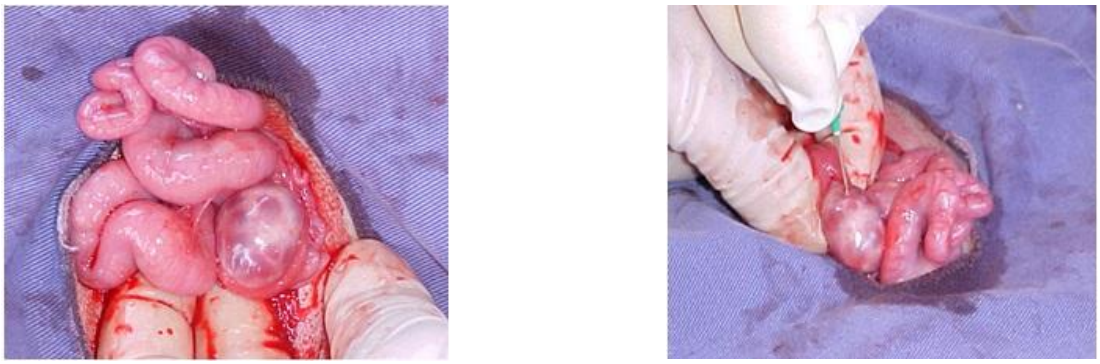

Figura 1. Ovário exposto para o procedimento de aspiração folicular, Jaboticabal, 2002.

A incisão cirúrgica foi suturada com fio categute nº 2 (peritônio e musculatura) e na pele sutura simples com nylon e fez-se antibioticoterapia (Oxitetraciclina - Pfizer do Brasil Ltda, partida 009/01 - 1mL kg^{-1} de peso corporal por três dias alternados). O monitoramento para a recuperação dos animais foi efetuado durante todo o processo cirúrgico e após, até o restabelecimento dos mesmos. Logo após, os oócitos foram transferidos ao Laboratório de FIV para o processo de avaliação e

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

seleção, maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário.

Os oócitos foram lavados por três vezes em TCM-199, suplementado com 20 mM de hepes, 5 mM de $NaHCO_3$ e 10% de soro de cabra no estro. O cultivo para maturação foi realizado por 27 horas a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO_2 em ar no TCM-199 (Sigma), suplementado com 10% de soro de cabra em estro, 1µg mL^{-1} de estradiol, 10 µg mL^{-1} de FSH e 10 µg mL^{-1} de LH. A extrusão do primeiro corpúsculo polar foi examinada por microscopia de contraste de fase em microscópio invertido para avaliação da taxa da maturação.

Para a determinação da capacitação espermática, submeteu-se o conteúdo de uma palheta média de sêmen congelado a um gradiente de Percoll (90/45) a uma força de 700 g durante 30 minutos, para separação dos espermatozóides viáveis.

O sedimento espermático foi ressuspenso em meio de fecundação suplementado com 20% de soro de ovelha no estro segundo Bavister (1989). A capacitação espermática foi de $1x10^6$ espermatozóides mL^{-1} em microgotas de 100 µL, sob óleo mineral durante 90 a 120 minutos à temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO_2 em ar de estufa específica da marca REVCO® para cultivo celular. Para o sêmen fresco foi utilizada a mesma metodologia, excetuando uma primeira lavagem por 10 minutos com TL-sêmen após a colheita e deste retirado 0,5 mL referente ao volume da palheta de sêmen congelado. Para o G4, 200µg mL^{-1} de heparina na capacitação espermática foi adicionado no lugar de 20% de soro de ovelha em estro.

Para a fertilização *"in vitro"* os oócitos maturados em laboratório foram adicionados aos espermatozóides capacitados nas gotas de meio imersos em óleo mineral. Incubou-se os oócitos em 100µL de meio de fecundação contendo $100x\ 10^3$ de espermatozóides, por 17 h a 38,5 ^oC, em estufa com 5% CO_2 em ar.

Após fecundação os prováveis zigotos foram transferidos para microgotas de 100 µl de meio SOF modificado, suplementado com 5 µg de BSA, 2,5% de soro fetal bovino e cultivado por sete dias à temperatura de 38,5°C, na atmosfera de 5% de CO_2 em ar. O meio foi parcialmente (50% a 70%) renovado a cada 48h. Os embriões foram avaliados com 30 e 144h para avaliação da clivagem e desenvolvimento embrionário conforme Martino et al (1994a, 1994b). Após esse prazo, as células foram submetidas ao cultivo e coloração por 10 minutos com 10 µg mL^{-1} de Hoeschst 33342 em meio de lavagem (TCM-199-Sigma). Observaram-se os oócitos corados em microscópio de epifluorescência para avaliação da dinâmica nuclear. Os fecundados apresentaram dois pró-núcleos e os não fecundados permaneceram em metáfase II.

Os embriões obtidos foram classificados de acordo com a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS, 1988), e depois congelados em fase de blastocistos e eclodidos. A adição do crioprotetor ocorreu em temperatura ambiente, durante 10 minutos para todos os embriões, em meio PBS (solução salina fosfato tamponada) + 0,4 % BSA (Albumina Sérica Bovina), compostos por etileno glicol em 1,5M. Os embriões foram envasados em palhetas de 0,25 mL e devidamente lacrados, foram levados à cuba contendo metanol, pois o equipamento de congelação foi o BIO COOL (FTS SYSTEMS), em temperatura de -6°C. Eles permaneceram por dois minutos para equilibrar com a temperatura da cuba, realizando o inicio da cristalização. Aguardou-se um minuto a mais para equilibrar a temperatura após a cristalização e assim iniciou-se o processo de resfriamento controlado (0,6°C $minuto^{-1}$), até atingir a temperatura de -35°C, quando as palhetas(duas, uma com dois embriões e outra com cinco) de 0,25mL foram mergulhadas em nitrogênio líquido e colocadas nas raques identificadas. Os embriões ficaram criopreservados por um ano.

Para a transferência dos embriões, inicialmente retirou-se os sete embriões (cinco em fase de expansão e dois eclodidos) das palhetas de 0,25 mL do nitrogênio líquido e agitando-a por 10 a 15 segundos, com posterior mergulho em banho maria à 30ºC por 10 a 15 segundos. Retiraram-se os embriões em uma placa de petri para localizá-los e transferí-los para uma solução de glicerol a 10 % e 1,0 M de sucrose por cinco minutos. Em seguida todos os embriões (sete) foram transferidos para uma solução de glicerol a 5% e 1,0 M de sucrose por mais cinco minutos. Após esse procedimento, estes foram levados para o meio de manutenção Holding plus, Cultilab® por três minutos e transferidos imediatamente para as três receptoras pela técnica de semi-laparoscopia no dia 21/03/2004. Uma fêmea (n°15) recebeu um embrião eclodido e um expandido em lado direito com corpo lúteo grau I, a fêmea n°71 recebeu três embriões (dois expandidos e um expandido), no lado direito com corpo lúteo grau I e a terceira, n°190, recebeu dois embriões

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

expandidos, do lado esquerdo e corpo lúteo grau I. As receptoras foram anestesiadas da mesma forma que as doadoras, identificada a qualidade do corpo lúteo e exposição do útero com deposição dos embriões ipsilateral da presença do corpo lúteo.

Por fim, foi realizada análise estatística para caracterizar os dados dos grupos em cada momento, utilizando médias e desvios padrão (X±s) e mediana (Md). Para as comparações entre grupos em cada momento, dependendo da variável, foram utilizados teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ou Análise de variância. Para as comparações entre momentos dentro de cada grupo foi utilizado teste não-paramétrico de Friedman. Em todas as análises efetuadas foram consideradas diferenças significativas quando $p<0,05$. Nos casos em que $0,05<p<0,10$ foi referida tendência à significância.

Resultados

Foram puncionados todos os folículos superiores a 3,0 mm, o que possibilitou a obtenção de 720 oócitos, em cinco grupos (31 animais). O número de oócitos obtidos separadamente por grupos foi 175; 139; 156; 126 e 124 para o G1; G2; G3; G4 e G5, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1.Número total de oócitos, oócitos maturados, oócitos fertilizados, oócitos clivados e blastocistos em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial, durante a estação e anestro estacional. Jaboticabal, 2002.

Grupos	Animais	Oócitos	Maturados	Fertilizados	Clivados	Blastocistos	Observações
G1	7	175	175	6	6	0	8 corpos lúteos
G2	5	139	139	9	9	2	Sem corpos lúteos
G3	5	156	156	18	18	5	Sem corpos lúteos
G4	7	126	126	0	0	0	2 corpos lúteos
G5	7	124	124	8	8	0	2 corpos lúteos
Total	31	720	720	41	41	7	12 corpos lúteos

Todos os oócitos colhidos foram submetidos ao processo de maturação, encontrando-se seis; nove; dezoito; zero e oito estruturas fertilizadas para o G1; G2; G3; G4 e G5. Todos os oócitos colhidos dos grupos apresentaram clivagem celular, sendo que a maior porcentagem foi verificada no G3, cujos animais encontravam-se em anestro estacional com fotoperíodo natural. O número de blastocistos produzidos foi zero; dois; cinco; zero e zero, respectivamente, para os grupos G1, G2, G3, G4 e G5 ($p>0,05$).

Todos os oócitos obtidos foram provenientes da aspiração por laparotomia, conseguindo estruturas com e sem *Cumulus Oophorus* (Figura 2).

A produção média de oócitos por animal, em ordem crescente, foi 17,7; 18,0; 25,0; 27,8 e 31,2, para o G5; G4; G1; G2 e G3, respectivamente, enquanto a porcentagem de clivagem foi zero; 3,42; 6,45; 6,47 e 11,5%, respectivamente para G4; G1; G5; G2 e G3. A produção de blastocisto foi zero para G1, G4 e G5; dois (1,4%) no G2 e cinco (3,2%) no G3. Foram encontrados oito corpos lúteos no G1, dois no G4 e G5, durante a estação reprodutiva, no período de anestro estacional, no G2 e G3 não foi observado nenhum corpo lúteo.

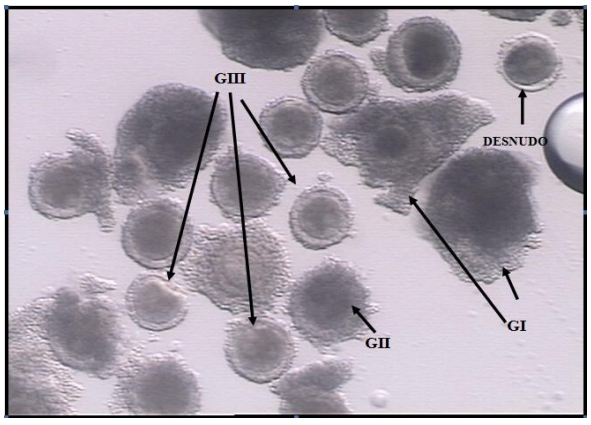

Figura 2. Figura demonstrativa dos complexos *cumulus* oócitos (COCS) obtidos por aspiração dos folículos de cabras submetidas à laparotomia, tratamento com fotoperíodo artificial e estimulção com FSH. GI: COCS de melhor qualidade. GII: COCS de qualidade média. GIII: COCS de qualidade baixa. DESNUDO: sem revestimento de células do *cumulus,* Jaboticabal, 2002

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

Houve diferença estatística (p<0,05) para a variável clivado (Tabela 2), sendo que (G1=G4=G5)<G3 com G2 intermediário. Nas outras variáveis, não houve diferença estatística (p>0,10).

Tabela 2. Número total de oócitos, oócitos maturados, oócitos clivados e blastocistos. Média, desvio padrão (X±s) e mediana (Md) em cada grupo. Estatística para a comparação entre grupos e comentários, Jaboticabal, 2002.

Grupos / Variável	G1	G2	G3	G4	G5	Estatística
Oócitos	18±10,64	27,8±10,38	31,2±5,64	25±9,18	20,7±6,45	p>0,10 grupos não diferem
Oócitos Maturados	18±10,64	27,8±10,38	31,2±5,64	25±9,18	20,7±6,45	p>0,10 grupos não diferem
Oócitos Clivados	0,86±0,83	1,8±0,75	3,6±1,02	0±0	1,3±0,94	P<0,05 (G1=G4=G5)< G3 G2 intermediário
Blastocistos	0±0	0,4±0,49	1±1,26	0±0	0±0	p>0,05 grupos não diferem

Os blastocistos foram obtidos nos G3 (5) e G2 (2) e foram congelados nessa fase (Figura 3 C).

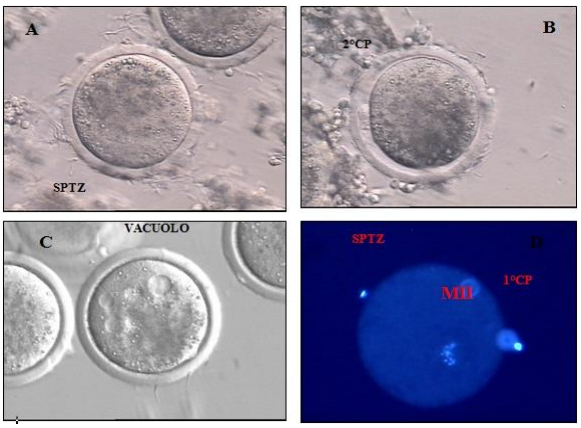

Figura 3. Figura demonstrativa dos oócitos e zigotos de cabras depois de serem submetidos à fecundação "*in vitro*" por 12 horas. A: oócito apresentando espermatozóides (SPTZ) aderidos à zona pelúcida. B: Zigoto apresentando o segundo corpúsculo polar (2°CP). C: oócito ou zigoto apresentando vacuolização (VACUOLO). D: oócito apresentando metáfase II (MII), primeiro corpúsculo polar (1°CP) e espermatozóide (SPTZ) aderido à Zona Pelúcida, Jaboticabal, 2002.

Iniciou-se o processo de maturação para todos os oócitos e após a maturação, todos apresentaram uma expansão celular e extrusão do corpúsculo polar após completar o processo (27h) (Figura 4 C) e assim foram colocados para fertilização.

Alguns oócitos aspirados apresentaram-se desnudos (Figura 2), porém a maioria apresentou "*Cumulus Oophorus*". A clivagem aconteceu após 27 h de maturação, 17 h de fertilização e 48 h de desenvolvimento (Figura 3 A e B), chegando a mórula e blastocistos do G2 e G3 (Figura 3 C), visualizados sete dias após a fertilização. Além disso, foram considerados fertilizados apenas os clivados, pois todos foram corados e não apresentaram penetração do espermatozóide. O G4 (heparina 200µg mL^{-1}) e G5 (sêmen fresco do mesmo animal) não atingiram blastocistos, porém o G5 apresentou 8 células clivadas em até 4 divisões (Figura 5). O diagnóstico de gestação foi realizado pelo exame de ultrassonografia, três meses após a transferência dos embriões, sendo positivo apenas o animal de número 15 (figura 6).

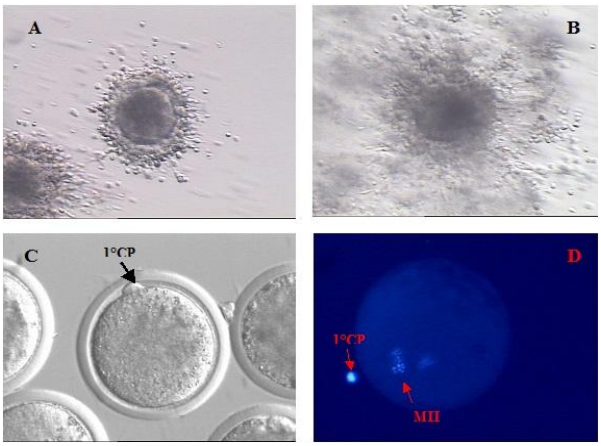

Figura 4. Figuras demonstrativas dos oócitos de cabras depois de cultivados para maturação durante 27 horas. A: oócito GII apresentando expansão do *cumulus*. B: oócito GI apresentando expansão do *cumulus.* C: oócito maturado apresentando o

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

primeiro corpúsculo polar (1°CP).D: oócito maturado e corado com Hoechst 33342, apresentando o primeiro corpúsculo polar (1°CP) e metáfase II (MII), Jaboticabal, 2002.

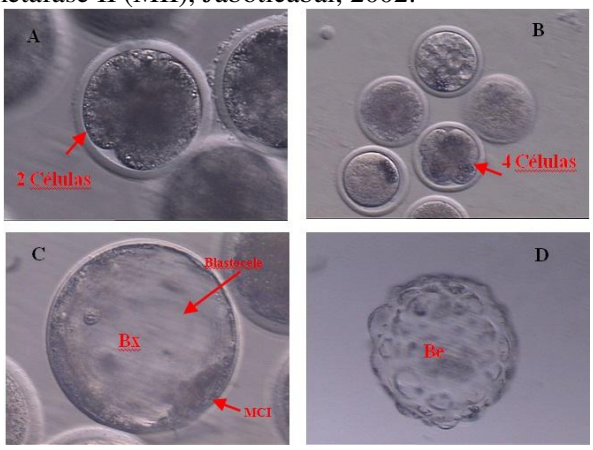

Figura 5. Figura demonstrativa dos embriões de cabras produzidos "*in vitro"* durante o cultivo nos diferentes estádios do desenvolvimento. A: embrião de cabra apresentando duas células. B: embrião de cabra apresentando 4 células. C: embrião de cabra no estádio de Blastocisto expandido (Bx) apresentando a Blastocele e Massa celular interna (MCI). D: embrião de cabra no estádio de Blastocisto eclodido (Be), Jaboticabal, 2002.



Figura 6. Ultrassom realizado em 10/06/2004 para o diagnóstico de gestação, Bahia, 2004.

Discussão

A dificuldade em trabalhar-se com FIV em caprinos para a região sudeste, onde se concentra o maior número de laboratórios do Brasil nessa área, está justamente na dificuldade de obtenção de ovários de matadouros de pequenos ruminantes. Já para a região nordeste, apesar de possuir o maior rebanho caprino nacional (IBGE, 2012), opõe-se pelo restrito número de laboratórios. Frente a essas dificuldades e limitações e estando na região sudeste a experimentação científica ora exposta, optou-se pela aspiração folicular por laparotomia, mantendo os animais vivos e aptos à reprodução posterior, pensando em produção animal viável e realizável. Apesar de Martino et al. (1994b) reconhecerem que a dissecção é mais vantajosa, acredita-se que a aspiração não apresente qualquer complicação. Para as condições brasileiras, a FIV pode, sem dúvida, ser empregada pela técnica de laparotomia e com FSH-ov, permitindo duas colheitas por animal em intervalo de seis meses. Porém a utilização de laparoscopia para a colheita de oócitos evita futuras aderências, bem como a possibilidade de se reutilizar fêmeas, principalmente em locais distantes de abatedouros que seriam fontes de ovários.

Younis et al. (1992) não obtiveram sucesso com a obtenção de filhotes vivos pelo método FIV, pois estes não chegaram a termo, morrendo antes do nascimento. Já os resultados para maturação e fertilização após emprego de heparina, foram satisfatórios. Concluíram que se chega a 50% de oócitos inseminados e 56% de clivados, o que não foi obtido no presente estudo mesmo tendo utilizado heparina (200µg mL^{-1}) no G4. Entretanto Younis et al. (1992) utilizaram 20% de soro de cabra em estro, enquanto neste experimento, utilizando-se apenas 10% de soro atingiram valores próximos a 100% na maturação dos oócitos. Neste experimento, dos sete embriões congelados e inovulados, nasceu um animal, fêmea, normal ao exame clínico, mestiça saanen/alpina, 3,8Kg, no dia 06/08/2004 na Bahia.

Os resultados obtidos por De Smedt et al. (1992) para oócitos provenientes de dissecção, portanto imaturos, atingiram 85% de maturação e 60% de fertilização. No presente experimento, usando sêmen congelado, obtiveram-se resultados diferentes com a mesma técnica. A fertilização "*in vitro*" não alcançou os resultados de De Smedt et al. (1992), entretanto para a maturação os resultados foram semelhantes (100%) (Figura 4). De acordo com Baldassarre (2012) o sucesso para obtenção de melhores taxas de fertilização e menor taxa de poliespermia na FIV está relacionada com o equilíbrio entre a origem do sêmen, do soro e uso de substâncias químicas para capacitação.

Martino et al. (1994b) observaram que, ao optar pela técnica de dissecção, os oócitos embora apresentem alta qualidade, são de baixo número, além de que a longa duração na colheita limita a utilização desse processo. Resultados mais satisfatórios seriam obtidos se houvesse condições de aspirar os folículos inferiores a três mm. No processo aspirativo realizado, apesar da maior

Revista Agrarian
ISSN: 1984-2538

quantidade de oócitos e alteração de *"Cumulus"* (células desnudas) (Figura 2), as células sofreram menor índice de autólise provavelmente pelo rápido tempo entre colheita e transporte ao laboratório para maturação. A aspiração in vivo de folículos tem como vantagem evitar o descarte de fêmeas com altos valores genéticos que por qualquer motivo, estejam impedidas da reprodução natural (Lima & Santos, 2010). A técnica de punção folicular guiada por ultrassom em caprinos é pouco utilizada no mundo, apesar de aumentar o aproveitamento dos óvulos (Paula, 2008). A importância do *cumulus* na FIV foi colocada em prova por estudo realizado por Souza et al. (2013). Em experimento, foram analisados oócitos desnudos no momento da coleta, desnudos propositalmente e com complexo *cumulus* intactos. Observou-se que a associação de oócitos com células *cumulus* tanto separadas como em íntimo contato, durante a MIV e/ou FIV melhoraram significativamemte a produção *in vitro* em embriões caprinos.

A melhora na maturação oocítica depende do tempo, sendo 27h o que apresentou melhores resultados nos testes efetuados, concordados com Martino et al. (1994a). A maturação empregada nesta experimentação, idêntica ao do autor citado anteriormente, com 27h e os oócitos provenientes de ovários de cabras Alpinas jovens (nulíparas) e adultas, sugerem que a semelhança na quantidade e qualidade dos oócitos provenientes das duas categorias animais, que atingiram a metáfase II, podem ser desafiados à fertilização, clivagem e desenvolvimento.

A coincidência do emprego da técnica na maturação e clivagem deste trabalho com o de Keskintepe et al. (1994) para TCM-199, 27h, LH e FSH, não favoreceram os mesmos resultados para o meio LH + FSH (52%) de clivagem que os pesquisadores atingiram. Foi adicionado a esse meio soro de cabra em estro, 1µg mL^{-1} de estradiol, o mesmo utilizado por Crozet et al. (1995), porém neste experimento empregou-se sêmen congelado e fresco. Entretanto não se obteve respostas semelhantes às técnicas citadas. Shabankareh et al. (2012) ressaltam a importância da suplementação do meio com vitaminas e proteínas para aumentar a habilidade de manutenção dos embriões durante a pré-implantação e pré-fixação, além de verificar que o uso de uma única vitamina (pantotenato) mostra-se mais eficiente do que o uso combinado destas. O uso do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-II) no meio estimula o desenvolvimento folicular *in vitro* dos oócitos, e mantem a morfologia folicular até o 6º dia de cultura (Duart et al., 2013). Araujo et al. (2011) verificaram a influência de diferentes protocolos de renovação em meios de cultura *in vitro* de isolados de folículos preantrais caprinos, concluindo que a adição periódica de meio é recomendada, por ser mais prática, manter a sobrevivência e promover o desenvolvimento de folículos preantrais caprinos cultivados *in vitro.*

Na tentativa de melhorar a fertilização neste experimento, 126 oócitos foram desafiados (G4) em mesmo meio da metodologia de fertilização proposto por Palomo et al. (1995a), porém aumentando-se de 100 para 200µg mL^{-1} de heparina segundo Palomo et al. (1995b), visto que com 100µg mL^{-1} os resultados não foram significativos na referência citada primeiramente, encontrando 55,47% e a 200µg mL^{-1} 45,29%. De acordo com os estudos de Souza et al. (2013) a presença de heparina na FIV contribui para o aumento da PIV em embriões caprinos.

Os resultados apresentados por Keskintepe et al. (1996), relacionados ao desenvolvimento *"in vitro"* dos oócitos maturados (41,6%), foram inferiores aos obtidos nesta experimentação (praticamente 100%), mesmo para os oócitos desnudos. A dosagem de heparina (100µg mL^{-1}) e ausência de soro animal não melhorou a fertilização e maturação oocítica segundo os autores, todavia acredita-se ser de real valia a utilização de soro animal na técnica de maturação, fertilização e clivagem para melhorar a resposta desses fatores.

Romaguera et al. (2011) descreveram a capacidade de desenvolvimento de oócitos obtidos em cabras de diferentes idades. Eles observaram que houve diferença significativa na produção de blastocistos de oócitos de fêmeas pré-puberes (5,45%) em fêmeas adultas (20%) menores do que três mm. Entretanto, esta diferença desaparece em oócitos recuperados de folículos grandes (18,07%). Neste trabalho, tentou-se comparar os resultados entre cabras adultas (multíparas e nulíparas de um ano de idade) (G4 e G5), e percebeu-se que não houve diferença significativa para o número de folículos, oócitos e maturação, levando-se a pensar que essas idades provavelmente não interferiram na resposta desses fatores mencionados.

Neste experimento, foram encontradas várias dificuldades que também foram constatadas por Amoah & Gelaye (1997), relacionadas à fertilização *"in vitro"*, capacitação e desenvolvimento embrionário para o tipo de sêmen

empregado em FIV de caprinos. Mais estudos ainda são necessários para determinação dos tipos de meio e também do sêmen ideal para utilização nestas condições de fertilização *in vitro*.

Após 27h de maturação *in vitro*, os crioprotetores não melhoraram as respostas na FIV de oócitos caprinos, apenas na MIV, possibilitando a vitrificação dessas células diretamente (Sharma et al., 2005). Utilizando metodologia semelhante, resultados de MIV também se mostraram satisfatórios no presente experimento.

Apesar da recomendação e bons resultados para MIV em oócitos caprinos com o TCM-199 + 20% de soro de cabra em estro (Kharche et al., 2006), com 10% do soro foi possível maturar os 720 oócitos obtidos por aspiração folicular, o que pode ser atribuído à técnica de obtenção dos oócitos utilizada.

Rocha et al. (2011) relataram em seu estudo a presença de receptores de melatonina encontrados na superfície dos folículos ovarianos, além de sua capacidade antioxidante, relacionada com a maturação e desenvolvimento do oócito. Dado este fato, Rocha et al. (2013) analisaram os efeitos da adição de melatonina e do FSH no desenvolvimento *in vitro* de foliculos pré-antrais caprinos, demonstrando um efeito dose-dependente positivo desses hormônios associados no crescimento folicular e de oócitos. No presente estudo, o uso de fotoperiodo artificial não promoveu melhora na produção dos oócitos.

O diâmetro do oócito, bem como a proteína $p34^{cdc2}$ e a respectiva atividade, podem estar relacionados com o desenvolvimento e competência embrionária em embriões caprinos quando produzidos por fertilização *in vitro*. Romaguera et al. (2010), ao comparar folículos de cabras pré-puberes, observou que há uma relação direta significativa entre folículo e diâmetro do oócito, e que os oócitos de folículos ≥ três mm apresentaram em seu estudo porcentagem de rompimento de vesícula germinativa significativamente maior. Entretanto, Chaves et al. (2010) em seu estudo concluíram que o diâmetro folicular não influencia a qualidade do complexo cumulus-oócito de fêmeas ovinas e caprinas. No presente estudo, foi selecionado folículo superior a três mm, e obteve-se 100% de maturação dos oócitos, porém os resultados foram inferiores na fertilização com Percoll® na capacitação espermática.

Conclusão

O fotoperíodo artificial não promoveu melhora na produção de oócitos caprinos, bem como na competência e desenvolvimento embrionário sob a latitude de 21°15´22´´S. Porém, produziu-se o primeiro produto FIV caprino no Brasil proveniente de embrião congelado produzido no fotoperíodo artificial, fêmea, mestiça saanen/alpina, nascida em 06/08/2004 e ainda viva na Bahia. Mais estudos são necessários ainda para melhorar a fertilização in vitro de oócitos caprinos sob as condições deste trabalho, principalmente para capacitação espermática.

Agradecimentos

FAPESP - Fundação de amparo à pesquisa do Estado de São Paulo, **UFMS** - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, **Capes** - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, **UNESP - Jaboticabal** – FCAV - Faculdade de Ciências Agrárias Veterinárias.

Referências

AMOAH, E.A.; GELAYE, S. Biotechnological advances in goat reproduction. **Journal Animal Science**, v.75, p.578-85, 1997.

ARAUJO, V.R.; CHAVEZ, R.N.; DUARTE, A.B.G.; CELESTINO, J.J.H.; SILVA, G.M.; FERNANDES, D.D.; MATOS, M.H.T; CAMPELLOC.C.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of culture medium replacement protocolo n the in vitro developement of isolated caprine secondary follicles. **Small Ruminant Research**. v.95, p.139-143, 2011.

BALDASSARRE, H. Practical aspects for implementing *in vitro* embryo production in cloning programs in sheep and goats. **Animal Reproduction,** v.9, n.3, p.188-194, 2012.

BARI, M.A.; KABIR, M.E.; SARKER, M.B.; KHAN, A. H. N. A.; MONIRUZZAMAN, M. Morphometric analysis of ovarian follicles of Black Bengal goats during winter and summer season. Bangladesh **Journal Science**, v.39, p.51-55, 2011.

BAVISTER, B.D. A consistently successful procedure for "in vitro" fertilization of golden hamster eggs. **Gamete Research**, v.23, p.139-58, 1989.

CHAVES, R.M.; FILHO, C.A.; SANTOS JUNIOR, E.; FILHO, J. A.; LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A.

L. Efeito do diâmetro folicular sobre a qualidade dos oócitos obtidos de ovários de ovelhas (*Ovis aries*) e cabras (*Capra hircus*). **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.3, p.663-688, 2010.

CHAVES, R.M.; SANTOS JUNIOR, E. R.; NEVES, J. P.; MOURA, M. T.; SILVA, J. C. F.; LIMA, P. F; OLIVEIRA, M. A. L. Influência das estações seca e chuvosa na capacidade de desenvolvimento de oócitos e produção *in vitro* de embriões da espécie caprina**. Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.1, p.135-142, 2013.

CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; DUBOS, M.P. Developmental competence of goat oocytes from follicles of diferent size categories following maturation, fertilization and culture "in vitro". **Journal of Reproduction and Fertility**, v.103, p.293-98, 1995.

CROZET, N.; DE SMEDT, N.; AHMED-ALI, M.; SÉVELLEC, C. Normal development following "in vitro" oocyte maturation and fertilizaation in the goats. **Theriogenology**, v.39, p.206, 1993.

DE SMEDT, V.; CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; MARTINO,A.; COGNIÉ, Y. *"in vitro"* maturation and fertilization of goat oocytes. **Theriogenology**, v.37, p.1049-60, 1992.

DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V.R.; CHAVES, R. N.; SILVA, G. M.; LUZ, V. B.; HAAG, K. T.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; ALMEIDA, A. P.; LOBO, C. H.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Insulin-like growth factor II (IGF-II) and follicle stimulating hormone (FSH) combinations can improve the in vitro development of grown oocytes enclosed in caprine preantral follicles**. Growth Hormone & IGF Research**, v.23, p. 37-44, 2013.

FAO-FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAOSTAT. Disponível em: faostat3.fao.org. Acesso em: 06.04.2013.

HANADA, A. *"In vitro"* fertilization in goats. **Japan Journal Animal Reproduction**, v.31, p.21-6, 1985.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. IBGE. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em: 06.04.2013.

KESKINTEPE, L.; DARWISH, M.G.; YOUNIS, I.A.; BRACKETT B.G. *"In vitro"* development of morulae from immature caprine oocytes. **Zygote**, v.2, p.97-102, 1994.

KESKINTEPE, L.; LUVONI, G.C.; RZUCIDLO, S.J.; BRACKETT, B.G. Procedural improvements for *"in vitro"* production of viable uterine stage caprine embryos. **Small Ruminant Research**, v.20, p.247-54, 1996.

KHARCHE, S.D.; GOEL, A.K.; JINDAL, S.K.; SINHA, NK. In vitro maturation of caprine oocytes in different concentrations of estrousgoat serum. **Small Ruminant Research**, v.64, p.186-89, 2006.

LIMA, G.L.; SANTOS E. A. A. Aplicação das biotécnicas de transferência de embriões e fertilização in vitro na reprodução de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica.** v.4, p.S43-50, 2010.

MARTINO, A.; PALOMO, M. J.; MOGAS, T.; PARAMIO, M. T. Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on *"in vitro"* maturation and fertilization. **Theriogenology**, v.42, p.859-73, 1994b.

MARTINO, A; MOGAS, T.; PALOMO, M. J.; PARAMIO, M. T. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v.41, p.969-80, 1994a.

PALOMO, M.J.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M.T. Effect o sperm pré-incubation time with heparin on IVF of prepubertal goat oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, n.15, p.68, 1995a.

PALOMO, M.J.; MOGAS, T.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M.T. Effect of heparin and sperm concentration on IVF of prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v.43, p.292, 1995b.

PAULA N.R.; CARDOSO, J.F.S.; OLIVEIRA, M.A.L.; FREITAS, V.J.F. Embriões caprinos produzidos *in vitro ou in vivo*: técnicas, problemas e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** v.32. n.1, p.21-35, 2008.

PATHAK, J.; KHARCHE, S.D.; GOEL, A.K.; JINDAL, S,K. A comparative study on parthenogenetic activation and embryo production from in vitro matured caprine oocytes. **Small**

Ruminant Research, disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.01.012>, 2013.

ROCHA, R.M.P.; LIMA, L.F.; ALVES, A.M.C.V.;CELESTINO, J.J.H.; MATOS, M.H.T.; LIMA-VERDE, I.B.; BERNUCI, M.P.M.;LOPES, C.A.P.; BÁOS, S.N.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Interection beteween melatonin and follocle-stimulating hormone promotes in vitro development of caprine preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v.44 p.1-9, 2013.

ROCHA, R.M.P.; MATOS, M.H.T.; LIMA, L.F.; SARAIVA, M.V.A.S.; ALVES, A.M.C.V.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Melatonina e reprodução animal: implicações na fisiologia ovariana. **Acta Veterinaria Brasílica**, v.5, n.2, p.147-157, 2011.

ROMAGUERA, R.; CASANOVAS, A.; MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; CATALÁ, M.; JIMENEZ-MACEDO, A. R.; MOGAS, T.; PARAMIO, M. T. Effect of follicle diameter on oocyte apoptosis, embryo development and chromosomal ploidy in prepubertal goats. **Theriogenology**, v.74, p.364-373, 2010.

ROMAGUERA, R.; MOLL X.; MORATÓ, R.; ROURA, M.; PALOMO, M. J.; CATALÁ, M. G.; GIMÉNEZ-MACEDO, A. R.; HAMMAMI, S., IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M. T. Pre-pubertal goat oocytes from large follicles result in similar blastocyst production and embryo ploidy tan those from adults goats. **Theriogenology**, v.76, ed.1, p.1-11, 2011.

SHABANKAREH, H. K.; KAFILZADEH, F.; SOLTANI, L. Treatment of ovine with certain water-soluble vitamins during in vitro maturation (IVM). **Small Ruminant Research**, v.104, p.139-145, 2012.

SHARMA, G.T.; KHARCHE, S.D.; MAJUMDAR, A.C. Vitrification of in vitro matured goat oocytes and the effect on in vitro fertilization. **Small Ruminant Research**, v.64, p.82-86, 2005.

SOUZA, J. M. G; DUFFARD, N.; BERTOLDO, M.J.; LOCATELLI, Y.; CORBIN, E.; FATET, A.; FREITAS. V. J. F.; MERMILLOD, P. Influence of heparin or the presence of cumulus cells during fertilization in vitro production of goats embryos. **Animal Reproduction Science**, v.138, n.1-2, p.82-89, 2013

WILKINSON, J. M.; STARK, B. A. Producción comercial de cabras. 19ed. Madrid: Acribia, 1987. 163p.

YOUNIS, A. I.; KESKINTEPE, L.; MACKIE, K.; BRACKETT, B.G. *"In vitro"* maturation and fertilization of Toggenburg goat oocytes. **Theriogenology**, v.37, n.1, p.330, 1992.