



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARILU CONSTANTINO MAX

**PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES NA ESPÉCIE OVINA:
EFEITO DO BENZOATO DE ESTRADIOL NA ASPIRAÇÃO
FOLICULAR E TRANSPORTE DE GAMETAS E EMBRIÕES
EM LONGAS DISTÂNCIAS**

Londrina
2011

MARILU CONSTANTINO MAX

**PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES NA ESPÉCIE OVINA:
EFEITO DO BENZOATO DE ESTRADIOL NA ASPIRAÇÃO
FOLICULAR E TRANSPORTE DE GAMETAS E EMBRIÕES
EM LONGAS DISTÂNCIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, Área de Concentração Sanidade Animal, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação -na-Publicação (CIP)

M463p Max, Marilu Constantino.

Produção in vitro de embriões na espécie ovina : efeito do benzoato de estradiol na aspiração folicular e transporte de gametas e embriões em longas distâncias / Marilu Constantino Max. – Londrina, 2011.
72 f. : il.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Ovino – Fertilização in vitro – Teses. 2. Ovino – Embrião – Teses. 3. Hormônios – Ovino – Teses. 4. Estradiol – Teses. 5. Transferência de embriões – Teses. I. Seneda, Marcelo Marcondes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 636.082.4:636.3

MARILU CONSTANTINO MAX

**PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES NA ESPÉCIE OVINA:
EFEITO DO BENZOATO DE ESTRADIOL NA ASPIRAÇÃO
FOLICULAR E TRANSPORTE DE GAMETAS E EMBRIÕES EM
LONGAS DISTÂNCIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, Área de Concentração Sanidade Animal, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo
UNESP – Botucatu – SP

Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros
UENP – PR

Londrina, 25 de março de 2011.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Lino e Deise Max, primeiramente por todos os ensinamentos de vida, sempre me mostrando os caminhos certos, e claro pelo apoio educacional para que eu aqui chegasse.

Ào meu marido Clayton, meu grande companheiro desta vida, te amo!

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida e pelas pessoas que fazem parte dela!

Aos meus pais, Lino e Deise, por todo amor, carinho, dedicação e muitos sacrifícios que fizeram para me darem condições que eu me formasse profissionalmente e mais importante, pessoalmente.

Minhas queridas irmãs, Marina e Mariana, companheiras de todas as horas, que também contribuíram para minha formação.

Amo muito vocês!!!

Ao meu marido e companheiro, Clayton, que sempre me apoiou nos meus sonhos e que também é responsável por hoje eu ser melhor que ontem. Te amo!

Ao Professor Marcelo Seneda, além de tudo um grande amigo. Se hoje estou aqui é por seu incentivo e sua credibilidade em meu trabalho. Obrigada por sempre me ajudar em tudo que precisei e por acreditar em mim.

Aos amigos, Fabiana de Andrade de Melo Sterza e Gustavo Martins Gomes dos Santos, que também me ajudaram muito na execução deste projeto, contruindo sempre um ambiente familiar e harmonioso de trabalho.

À Professora Maria Isabel, pela gentil contribuição durante a qualificação.

Ao Thales e Wanessa, que além de amigos queridos, me ajudaram no delineamento deste trabalho e na qualificação. Thales obrigada também por participar da banca de defesa.

Ao Professor Sony Dimas Bicudo, pela gentileza em participar da banca de defesa.

Aos colegas do grupo do Laboratório de Reprodução Animal da UEL, Alethéia, Evelyn, Fabiana, Kátia, Karine, José Henrique, Letícia, Lívia, Mariana, Roberta, Tiago, Thales e Wanessa, que acompanharam o desenvolvimento do meu trabalho.

À Helenice, pelo carinho dedicado aos alunos da pós-graduação, e ao Professor Amauri, pelo constante esforço em melhorar a estrutura do Programa de Pós-graduação da UEL.

Aos residentes do HV da UEL, estagiários e funcionários pela ajuda.

Por último, gostaria de agradecer aos animais que permitiram que este trabalho fosse executado.

Muito Obrigada!

Para aquele que crê, o impossível é tarefa que somente demora um pouco para ser realizada, já que o possível se pode realizar imediatamente.

A perseverança é o combustível dos vencedores. Mas não dos vencedores mundanos, de vitórias superficiais e transitórias. Mas daqueles que vencem a si mesmos, que vencem dificuldades no anonimato.

(Redação do Momento Espírita com base no cap. 39, do livro Convites da vida, pelo Espírito Joanna de Angelis, psicografia de Divaldo Pereira Franco)

MAX, Marilu Constantino. **Produção *in vitro* de embriões na espécie ovina: efeito do benzoato de estradiol na aspiração folicular e transporte de gametas e embriões em longas distâncias.** 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi comparar o número de folículos, oócitos e a taxa de recuperação em ovelhas submetidas ao protocolo *One Shot* com e sem o uso do Benzoato de Estradiol; e com base nos resultados do primeiro experimento, utilizou-se o melhor protocolo hormonal para obtenção de oócitos e assim relatar a viabilidade do transporte de gametas femininos e embriões ovinos produzidos *in vitro* por longas distâncias. No primeiro experimento utilizou-se 33 ovelhas pluríparas, mestiças (1/2 sangue Texel), lanadas, não lactantes, idade média 5 anos e com ECC $3,0 \pm 0,3$ que foram divididas em 3 grupos. O grupo *One Shot* (n=10) recebeu 1,5 mg de norgestomet (Crestar®, Intervet, Holanda) no D0 e este foi mantido por 10 dias. No D8 foi administrado 0,04mg de D-cloprostenol sódico (Preloban®, Intervet, Holanda), 200 UI FSH (Pluset®, Hertape Calier, Espanha) e 300 UI de eCG (Folligon®, Intervet, Holanda). No grupo Benzoato (n=11), a única diferença em relação ao grupo *One Shot* foi a administração de 0,6 mg de benzoato de estradiol (Estrogin®, Famavet, Brasil) em D0. No Grupo Sem Tratamento (n =12) os animais não receberam nenhum estímulo hormonal. A coleta dos oócitos foi realizada através de laparotomia 36 horas (D10) após a administração das gonadotrofinas. Foi observado aumento ($P < 0,05$) na média de folículos aspirados no grupo *One Shot* em relação ao grupo sem estímulo hormonal e o Benzoato ($16,3 \pm 5,6$; $9,5 \pm 2,4$ e $12,1 \pm 4,1$). As médias de oócitos recuperados e a taxa de recuperação foram superiores ($P < 0,05$) no grupo *One Shot* e no Benzoato em relação ao grupo Sem Tratamento, resultando em $14,2 \pm 9,0 / 87,1\%$ (142/163); $11,0 \pm 6,2 / 91,4\%$ (122/134) e $6,8 \pm 3,5 / 71,9\%$ (82/114), respectivamente. No segundo experimento, foram utilizadas 5 ovelhas pluríparas da raça Santa Inês com ECC médio de 3,0 que foram submetidas a tratamento hormonal *One Shot*. A aspiração folicular (OPU) foi via laparotomia. Os oócitos selecionados foram envasados em TCM 199 (Nutricell, Brasil), gaseificados com CO₂ e armazenados em incubadora de transporte (WTA, Sorocaba, São Paulo) com ambiente controlado em 38,5 °C e 5% de CO₂. O transporte dos oócitos por 583 km foi realizado por meio rodoviário durante 14 horas até o laboratório de produção *in vitro* de embriões (PIVE), onde os oócitos completaram o período de maturação, foram fecundados com a mesma partida de sêmen e tiveram o cultivo iniciado em meio de cultivo SOF ovine. Após 4 dias, os embriões foram submetidos ao trajeto de retorno e enviados nas mesmas condições de transporte. Obteve-se uma média de $9,8 \pm 3$ (49 / 5) embriões por doadora e 25 mórulas da Grau I foram transferidas em 7 receptoras, sendo 3 a 4 embriões no estágio de mórula, no ápice do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal 30 dias após a transferência. Uma prenhez (14,3% - 1/7) foi confirmada de uma receptora que apresentava 4 CLs. Um cordeiro saudável nasceu de parto eutócico após período gestacional normal. Os resultados demonstram que o *One Shot* foi o melhor protocolo para obtenção de oócitos e é possível obter-se prenhez a partir da PIVE, com transportes de oócitos e embriões por até 14 horas.

Palavras-chave: Ovinos. *One Shot*. Benzoato de Estradiol. Oócitos. Protocolos.

MAX, Marilu Constantino. *In vitro* production of embryos in sheep: effects of estradiol benzoate in follicular aspiration and transportation of gametes and embryos in long distance. 2011. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the number of follicles, oocytes and the recovery rate in sheep submitted to *One Shot* protocol with and without the use of estradiol benzoate, and based on the results of the first experiment, we used the best hormonal protocol to obtain oocytes and thus to report the feasibility of transporting sheep female gametes and embryos produced *in vitro* over long distances. In the first experiment we used 36 sheep pluriparous, crossbred (1 / 2 blood Texel), tossed, not lactating, mean age 5 years and 3.0 ± 0.3 with BCS who were divided into three groups. The *One Shot* group (n = 10) received 1.5 mg of norgestomet (Crestar®, Intervet, Holland) at D0 and it was maintained for 10 days. D8 was administered 0.04 mg D-cloprostenol (Preloban®, Intervet, Holland), 200 IU FSH (Pluset®, Hertape Calier, Spain) and 300 IU of eCG (Folligon®, Intervet, Holland). In benzoate group (n = 11), the only difference with the *One Shot* group was the administration of 0.6 mg of estradiol benzoate (Estrogen®, Famavet, Brazil) in D0. In the untreated group (n = 12) animals received no hormone stimulation. The collection of oocytes was performed by laparotomy 36 hours (D10) after administration of gonadotropins. An increase was observed (P <0.05) in the middle of aspirated follicles in group *One Shot* against the group without hormonal stimulation and benzoate (16.3 ± 5.6 , 9.5 ± 2.4 and 12.1 ± 4 , 1). The mean of oocytes recovered and recovery rate were higher (P <0.05) in *One Shot* and benzoate as compared to group without treatment, resulting in 14.2 ± 9.0 / 87.1% (142/163), 11.0 ± 6.2 / 91.4% (122/134) and 6.8 ± 3.5 / 71.9% (82/114), respectively. In the second experiment, five pluriparous Santa Ines ewes with BCS average of 3.0 were subjected to hormone treatment *One Shot*. Follicular aspiration (OPU) was by laparotomy. The selected oocytes were loaded in TCM 199 (Nutricell, Brasil) and aerated with CO₂ and stored in a transport incubator (WTA, Sorocaba, Brasil) with a controlled environment at 38.5 ° C and 5% CO₂. The transport of oocytes by 583 km was carried out by road for 14 hours to the laboratory for *in vitro* production of embryos (IVEP), where the oocytes completed the period of maturation, were fertilized with semen from the same male and had started growing in culture medium SOF ovine. After four days, the embryos were subjected to the return path and sent under the same conditions of carriage. It was obtained an average of 9.8 ± 3 (49 / 5) embryos per donor and 25 morulae were transferred into 7 recipients, 3 to 4 embryos at morula stage, at the height of the uterus ipsilateral the corpus luteum. Pregnancy diagnosis was performed by transrectal ultrasonography 30 days after embryo transfer. One pregnancy (14,3% - 1/7) was confirmed and one healthy lamb was born after an eutocic parturition and normal pregnancy period. The results show that the *One Shot* was the best protocol to obtain oocytes and it is possible to get pregnant from IVEP, with transport of oocytes and embryos for 14 hours.

Keywords: Ovine. *One Shot*. Estradiol benzoate. Oocytes. Protocols..

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO A

- Figura 1** – Diagrama esquemático do protocolo do grupo One Shot administrado em ovelhas adultas e lanadas no início da estação reprodutiva.....34
- Figura 2** – Diagrama esquemático do protocolo do grupo Benzoato administrado em ovelhas adultas e lanadas no início da estação reprodutiva.....34
- Figura 3** – Porcentagem de folículos dominantes por grupo observados no momento da aspiração folicular de ovelhas adultas e lanadas, submetidas a protocolos hormonais pré aspiração folicular no início da estação reprodutiva.38

ARTIGO B

- Figura 1** – Diagrama esquemático do protocolo One Shot administrado nas doadoras Santa Inês no início da estação reprodutiva.....50
- Figura 2** – Diagrama esquemático do protocolo de sincronização realizados nas receptoras Santa Inês para transferência dos embriões no início da estação reprodutiva.....51

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A

Tabela 1 – Número de folículos, oócitos e taxa de recuperação obtidos de ovelhas adultas e lanadas submetidas a protocolos hormonais pré aspiração folicular no início da estação reprodutiva.....37

Tabela 2 – Número total de oócitos, porcentagem de viáveis e degenerados obtidos após a aspiração folicular de ovelhas adultas e lanadas submetidas a dois protocolos hormonais pré aspiração folicular no início da estação reprodutiva.....38

ARTIGO B

Tabela 1 – Média e qualidade de oócitos recuperados e embriões obtidos por doadora após a aspiração folicular por laparotomia e produção de embriões ovinos in vitro.....55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIDR[®]	<i>Controlled Intravaginal Drug Release</i> – Dispositivo Intravaginal Liberador de Progesterona Natural
CL	Corpo Lúteo
eCG	<i>Equine Chorionic Gonadotropin</i> – Gonatrofina Coriônica Equina
FGA	<i>Fluorgestone Acetate</i> – Acetato de Fluorogestona
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> – Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i> – Hormônio Liberador de Gonadotrófinas
LH	<i>Luteinizing Hormone</i> – Hormônio Luteinizante
MAP	<i>Medroxyprogesterone Acetate</i> – Acetato de Medroxiprogesterona
P4	Progesterona
BE	Benzoato de Estradiol
PGF2α	Prostaglandina F2 Alfa
IA	Inseminação Artificial
TE	Transferência de Embriões
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
ml	Mililitros
UI	Unidades Internacionais
mg	Miligramas

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
REVISÃO DE LITERATURA	16
REFERÊNCIAS	21
JUSTIFICATIVA	25
HIPÓTESES	26
OBJETIVOS	27
EXPERIMENTO A	27
Objetivo Geral	27
Objetivos Específicos	27
EXPERIMENTO B	27
Objetivo Geral	27
Objetivos Específicos	27
ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	28
ARTIGO A - AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO BENZOATO DE ESTRADIOL ASSOCIADO AO PROTOCOLO ONE SHOT NA RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS NA ESPÉCIE OVINA	29
RESUMO	30
ABSTRACT	30
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
Local.....	33
Animais	33
Distribuição dos grupos e tratamentos.....	33
Descrição da técnica de laparotomia e aspiração folicular.....	35
Descrição da técnica para busca e classificação dos oócitos	36

Delineamento experimental e análise estatística	36
RESULTADOS	36
DISCUSSÃO	38
CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

ARTIGO B – PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES NA ESPÉCIE OVINA: RELATO DA OBTENÇÃO DE PREENHEZ APÓS LONGOS PERÍODOS DE TRANSPORTE DE OÓCITOS E EMBRIÕES	46
RESUMO.....	47
ABSTRACT	47
INTRODUÇÃO	48
MATERIAL E MÉTODOS	49
Local.....	49
Animais	50
Preparação das doadoras	50
Preparação da receptoras	51
Descrição da técnica de aspiração folicular via laparotomia	51
Manipulação e classificação dos oócitos.....	52
Transporte dos oócitos.....	53
Procedimentos no laboratório de pive	53
Descrição da técnica de transferência de embriões.....	53
RESULTADOS	54
DISCUSSÃO	55
CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	58

INTRODUÇÃO

A ovinocultura é uma atividade em crescimento no Brasil. Nos últimos anos,

têm se observado volumes crescentes dos abates, da demanda do mercado doméstico, das importações e do consumo da carne (SILVA, 2008). O levantamento do último censo mostra que o Brasil apresenta um efetivo de 16.811 milhões de cabeças (IBGE, 2009).

O crescente interesse dos produtores pelas atividades da ovinocultura e caprinocultura explica-se principalmente por alguns fatores: a grande valorização de áreas rurais, a competição de espaço entre a agricultura e a pecuária e a rapidez do ciclo produtivo, que nos ovinos é aproximadamente 2,5 vezes mais rápido que nos bovinos (HINDO, 2006).

A necessidade de aumentar e melhorar o rebanho ovino demonstra a busca premente de um real estabelecimento das biotecnologias da reprodução, em todas as suas etapas de desenvolvimento. Estas biotecnologias, quando devidamente empregadas, são fortes aliadas e respondem por significativas melhorias na produtividade e rentabilidade dos rebanhos (SIMPLICIO et al., 2007).

Técnicas como inseminação artificial (IA), manipulação e conservação do sêmen tem registros desde a década de 40 (Mies Filho, 1987). Entretanto, históricos e até mesmo anátomo-fisiológicos jamais tomaram a proporção observada em bovinos.

A demanda atual tem feito com que diversas pesquisas sejam realizadas para que, tanto as técnicas acima citadas, bem como a transferência de embriões (TE), e mais recentemente, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) tornem-se cada vez mais aplicadas na cadeia produtiva de ovinos.

Apesar das perspectivas promissoras, os programas de TE apresentam algumas limitações, como a grande variação dos animais com relação à resposta superovulatória, as dificuldades anatômicas para a colheita de embriões e mesmo para a IA com sêmen congelado.

Em decorrência das limitações da TE, a PIVE vem se destacando, pois pode ser uma técnica alternativa ou complementar à produção *in vivo* de embriões. A PIVE torna mais eficiente e racional o uso de sêmen congelado, pois na

fecundação *in vitro* há um controle melhor da manipulação do gameta masculino. Além disso, fêmeas com restrições anatômicas em cérvix e útero podem ser submetidas à obtenção *in vivo* dos oócitos, aumentando assim sua longevidade reprodutiva.

Apesar dos aspectos promissores, muitos outros ainda apresentam restrições para uma ampla utilização da PIVE, desde os protocolos para a aspiração folicular, passando pelos procedimentos de maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento dos embriões, até o momento da transferência.

Considerando-se os protocolos de aspiração folicular, um aspecto peculiar é a reduzida utilização do Benzoato de Estradiol na espécie ovina, pois este fármaco, de baixo custo, tem sido amplamente utilizado em bovinos, em protocolos para diversas biotecnologias. Desta maneira, seria de alta pertinência um estudo para aferir os efeitos do BE sobre a obtenção de oócitos, visando a produção *in vitro* de embriões.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a utilização da produção *in vitro* de embriões na espécie ovina, desde os protocolos pré aspiração folicular até manipulação de gametas e embriões *in vitro*.

REVISÃO DE LITERATURA

A ovinocultura é carente em tecnologias avançadas bem como em investimentos na formação e qualificação de mão de obra especializada. Apesar das limitações existentes, tem havido uma crescente demanda por parte da iniciativa privada nas biotecnologias da reprodução que visem o incremento da produtividade e da rentabilidade dos rebanhos. Dentre estas biotecnologias podemos ressaltar a sincronização de estros, inseminação artificial (IA), utilização da ultrassonografia, transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE; GUSMÃO; ANDRADE MOURA, 2005).

As biotecnologias reprodutivas estão diretamente ligadas ao sucesso da produção de ovinos, pois este é determinado, entre outros fatores, pela produção de cordeiros para abate, que varia em função do número de matrizes e seu desempenho reprodutivo (SASA, 2003).

A produção de cordeiros alcançou um patamar mais sólido com o desenvolvimento da sincronização do estro, na década de 60, pois isto facilitou o uso de técnicas de inseminação artificial em ovelhas e permitiu a concentração dos partos (Menchaca et al., 2004). Com o melhor conhecimento da sincronização do estro, os progestágenos passaram a ser amplamente utilizados, tanto no período de atividade reprodutiva, como no período de estacionalidade (UNGERFELD; RUBIANES, 2002; KOHNO et al., 2005; DOGAN; NUR, 2006; OZYURTLU et al., 2008).

Como vantagens da sincronização de estros, podemos citar a concentração dos cios, concentração da mão-de-obra, indução da ciclicidade de fêmeas em anestro, diminuição do intervalo entre partos, melhor utilização do reprodutor, maiores taxas de prenhez no início das estações de monta e homogeneização dos lotes, com maiores ganhos na comercialização (HENDERSON et al., 1984).

A sincronização de estro é uma técnica bastante utilizada juntamente com a inseminação artificial, gerando benefícios como, por exemplo, a diminuição do intervalo entre gerações e maior homogeneidade dos lotes. Entretanto é uma biotecnologia que propicia uma melhor disseminação do material genético dos

machos. Já a produção de embriões, seja a TE ou a PIVE, propicia uma complementaridade biológica dos genomas masculino e feminino, resultando em rápido incremento genético e menor intervalo entre gerações (FREITAS; SIMPLÍCIO, 2001; MOBINI; HEATH; PUGH, 2005).

A TE vem sendo utilizada há vários anos, mas com resultados muito variáveis. Gusmão et al. (2007) relataram que 26% das doadoras superovuladas não responderam ao tratamento, com uma grande variação de embriões recuperados - 0 a 31 por doadora. Simonetti et al. (2007), demonstraram casos de ampla variação na produção de embriões em até 77% das doadoras. Além da variabilidade à resposta superovulatória, falhas na fecundação dos oócitos são muito comuns (COGNIÉ et al., 2003; TRALDI, 2006; BALDASSARRE, 2007; GUSMÃO et al., 2007, SIMPLÍCIO et al., 2007). Acredita-se que uma das causas da variação da resposta superovulatória esteja relacionada com a presença de folículos maiores ou iguais a 6 mm no momento do início da superovulação. Traldi (2006) afirmou ainda que fatores genéticos, nutricionais e estacionais exerçam forte influência em tal aspecto. A baixa taxa de fecundação ocorre provavelmente pela assincronia das ovulações após a retirada do progestágeno (COGNIÉ et al., 2003). Traldi (2006) acrescentou que uma das causas da baixa taxa de fecundação dos oócitos em programas TE refere-se a grande quantidade de muco produzido por fêmeas superovuladas, o que incompatibiliza o transporte espermático e conseqüentemente a fecundação dos oócitos ovulados.

Considerando as informações supra citadas, a produção de embriões *in vitro* (PIV) tem se tornado uma alternativa bastante interessante para a realização de pesquisas básicas, bem como para uso comercial das biotecnologias da reprodução (COGNIÉ et al., 2004). Algumas das vantagens da PIV em relação a TE foram citadas por Baldassarre (2007), sendo elas: o método de obtenção dos oócitos *in vivo*, realizado através de laparoscopia é menos traumático que os métodos tradicionais de recuperação de embriões em programas TE de ovinos. Por esse motivo o procedimento pode ser repetido com maior frequência durante a vida reprodutiva das doadoras. Além disso, a OPU evita problemas como a baixa taxa de ovulação, baixa taxa de fecundação e alta incidência de regressão prematura de corpos lúteos. O mesmo autor ressalta que é extremamente raro que na OPU uma doadora produza menos que um embrião transferível por sessão. Outra vantagem ainda é o fato desta biotécnica parecer ser menos influenciada pelos fatores da

estacionalidade (PIERSON et al., 2004). Apesar de todas as vantagens apresentadas, muitos aspectos ainda precisam ser melhores definidos, desde os protocolos pré-aspiração e técnicas de colheita dos oócitos até o momento da transferência.

Um dos pontos que tem sido largamente estudado é a preparação das doadoras para OPU. Vários autores avaliaram protocolos, testando estimulações com doses únicas ou múltiplas de eCG ou FSH, e até mesmo a associação entre eles, bem como o uso de GnRH ou seus antagonistas e também de estradiol, tendo em vista a busca do maior número de folículos por aspiração, melhor taxa de recuperação, melhor qualidade dos oócitos recuperados, bem como a melhor produção de embriões *in vitro* (BERLINGUER et al., 2006; KELLY et al., 2005; BERLINGUER et al., 2004; COGNIÉ et al., 2004; KELLY et al., 2004; KOEMAN et al., 2003; ALBERIO et al., 2002; BALDASSARRE et al., 2002; BALDASSARRE et al., 1996; PTAK et al., 1999; O'BRIEN et al., 1997).

Tais protocolos culminaram em ampla variação em todos os aspectos, contudo os mais promissores são os de Baldassarre (2007) que afirmou que tem obtido há vários anos uma média de 14 oócitos por doadora, com uma taxa de recuperação média de 80%, e uma média de 8 embriões por doadora, seguidas de 50 a 80% de taxa de prenhez após transferência. Os dados apresentados mostram o potencial da técnica em produzir bons resultados, os quais podem ser inclusive melhorados com a aplicação de novas tecnologias.

O número final de embriões transferíveis aumenta de acordo com o maior número de folículos responsivos às gonadotrofinas. Isto depende da ausência do folículo dominante ao início do tratamento superovulatório (GONZALEZ-BULNES et al., 2004). Em bovinos a ablação do folículo dominante tem sido descrita como método para melhorar a recuperação de embriões (BUNGARTZ; NIEMMAN, 1994) embora menos eficiente em ovinos devido ao tamanho dos animais e suas características do trato genital (GONZALEZ-BULNES et al., 2004). A melhor opção nesta espécie é induzir baixos níveis de LH e FSH, visto que a dominância é estabelecida em altas concentrações de LH (GONZALEZ-BULNES et al., 2004).

O número de folículos disponíveis para a aspiração folicular apresenta considerável variação conforme a dinâmica folicular, sendo o início da onda o momento mais favorável para a recuperação, pelo maior número de folículos e pela melhor eficiência na captação dos oócitos a partir de folículos menores

(SENEDA et al., 2001). Em bovinos, quando a aspiração folicular é realizada independente da fase do ciclo estral, mais de 85% dos folículos ovarianos são atresícos. Existem fortes evidências de que o estágio de desenvolvimento do folículo é importante para determinar a qualidade do oócito (SIRARD et al., 1999, CASTILHO et al., 2007).

Com o objetivo de incrementar a recuperação de oócitos, diversos protocolos pré-aspiração tem sido estabelecidos visando controlar a onda de crescimento folicular. Em bovinos, dentre as formas de controle do crescimento folicular, o tratamento com progesterona e estradiol têm sido eficazes para promover a atresia dos folículos em desenvolvimento, e a emergência de uma nova onda folicular 3 a 5 dias após (4,3 em média), devido à ação inibitória destes dois hormônios sobre o FSH (BÓ et al., 1994; BÓ et al., 2006). Assim, a resposta gonadotrófica em bovinos é melhor quando é iniciada exatamente no momento da emergência da onda folicular (NASSER et al., 1993, ADAMS et al., 1994). Nesta condição, pode-se obter maior número de folículos após a aplicação das gonadotrofinas (BÓ et al., 2002).

Um dos mais consagrados protocolos para a aspiração folicular em ovinos é o *One Shot*, com o qual pode-se obter média de 12 folículos/doadora por procedimento, com uso associado de FSH, eCG e PGF 2α , além de uso concomitante do implante de progesterona (BALDASSARRE et al., 1996). Tal valor mostra-se bastante superior à média de 7 folículos por doadora, quando não se usa nenhum protocolo (KÜHHOLZER et al., 1999).

Na espécie bovina, obtém-se maior eficiência dos protocolos quando se programa a regressão folicular ao início do tratamento, com de uso do Benzoato de Estradiol, em conjunto com uma fonte de Progesterona (BÓ et al., 2006). Desta maneira, há um maior aproveitamento das gonadotrofinas exógenas quando estas são aplicadas exatamente no momento da emergência da onda folicular iniciada após a regressão da primeira onda (NASSER et al., 1993, ADAMS et al., 1994). De modo geral, fêmeas da espécie bovina apresentam emergência de uma nova onda folicular ao redor de três a quatro dias após a aplicação de estradiol 17 beta e progesterona (MEIKLE et al., 2001, BARRET et al., 2008). Apesar da eficácia do estradiol 17 beta, este tem sido cada vez mais substituído pelo benzoato de estradiol, considerando-se a eficácia semelhante e um custo muito menor.

Apesar dos avanços e ampla utilização da associação estrógeno e progesterona em bovinos, como recurso eficiente para induzir a regressão de folículos antrais, há escassos trabalhos semelhantes na espécie ovina. Talvez o reduzido número de relatos seja causado pelas restrições da espécie, como grandes variações no intervalo entre ondas (BARRET et al., 2008), no número de ondas (GINTHER et al., 1995) e na extensão do ciclo (BARTLEWISKI et al., 1999). Apesar de tais desafios, a expectativa de agregar uma fonte de estrógeno ao consagrado protocolo *One Shot* mostra-se bastante promissora, pela perspectiva de incrementar o aproveitamento do eCG, caso o estrógeno, em colaboração com o implante de progesterona, fosse eficiente em causar a regressão folicular ao primeiro dia do protocolo.

Já foi estudada a utilização do estradiol 17 beta juntamente com uma fonte de progesterona, tendo as ovelhas apresentado emergência de nova onda folicular aproximadamente 4 a 7 dias após (BARRET et al., 2008). No entanto, seria interessante considerar a substituição do estradiol 17 beta pelo benzoato de estradiol, considerando o menor custo e a maior disponibilidade deste.

Considerando os aspectos supracitados, o presente trabalho refere-se à associação do benzoato de estradiol ao protocolo *One Shot*, buscando-se incrementar a obtenção *in vivo* de oócitos para a produção *in vitro* de embriões.

REFERÊNCIAS

- ADAMS GP, NASSER LF, BO GA, MAPLETOFT RJ, GARCIA A, DEL CAMPO MR. Superstimulatory response of ovarian follicles of wave 1 versus wave 2 in heifers. **Theriogenology**, v.42, p.1103-13, 1994.
- ALBERIO R, OLIVEIRA J, ROCHE A, ALABART J, FOLCH J. Performance of a modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes. **Small Ruminant Research**, v.46, p.81-87, 2002.
- BALDASSARE H, FURNUS CC, DE MATOS DG, PESSI H. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis; alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. **Theriogenology**, v.45, p.707-717, 1996.
- BALDASSARRE H, RAO KM, NEVEU N, BROCHU E, BEGIN I, BEHBOODI E, HOCKLEY DK. Laparoscopic ovum pickup followed by in vitro embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. **Reproduction Fertility and Development**, v.19, p.612-616, 2007.
- BALDASSARRE H, WANG B, KAFIDI N, KEEFER C, LAZARIS A, KARATZAS CN. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. **Theriogenology**, v.57, p.275-284, 2002.
- BALDASSARRE H. Aplicaciones prácticas de la producción de embriones *in vitro* en la especie caprina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.3, p.261-267, 2007a.
- BARRET DMW, BARTLEWSKI PM, DUGGAVATHI R, DAVIES KL, HUCHKOWSKY SL, EPP T, RAWLINGS NC. Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewes: The effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, v.69, p.827-836, 2008.
- BARTLEWSKI PM, BEARD AP, COOK SJ, CHANDOLIA RK, HONARAMOOZ A, RAWLINGS NC. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.115, p.111-124, 1999.
- BERLINGUER F, GONZALEZ-BULNES A, SUCCU S, LEONI G G, VEIGA-LOPEZ A, MOSSA F, GARCIA-GARCIA R M, BEBBERE D, GALIOTO M, COCERO M J E NAITANA S. GnRH antagonist enhance follicular growth in FSH-treated sheep but affect developmental competence of oocytes collected by ovum pick-up. **Theriogenology**, v.65, p.1099-1109, 2006.
- BERLINGUER F, LEONI G, BOGLIOLO L, PINTUS PP, ROSATI I, LEDDA S, et al. FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of

embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep.

Theriogenology, v.61, p.1477–86, 2004.

BO GA, ADAMS GP, PIERSON RA, CACCIA M, TRIBULO H, MAPLETOFT RJ. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with a progestogen implant. **Theriogenology**, v.41, p.1555-1569, 1994.

BO GA, BARUSELLI PS, CHESTA PM, MARTIN CM. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, v.65, p.89-101, 2006.

BO GA, BARUSELLI PS, MORENO D, CUTAIA L, CACCIA M, TRIBULO R et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v.57, p.53-72, 2002.

BUNGARTZ L., NIEMANN H. Assessment of the presence of dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.583-591, 1994.

CASTILHO C, ASSIS GS, GARCIA JM. Influência do diâmetro e da fase folicular sobre a competência *in vitro* de oócitos obtidos de novilhas da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.2, p.288-294, 2007.

COGNIE Y, BARIL G, POULIN N, MERMILLOD P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, v.59, p.171-88, 2003.

COGNIE Y, POULIN N, LOCATELLI Y, MERMILLOD P. State-of-the-art production, conservation and transfer of invitro-produced embryos in small ruminants. **Reproduction Fertility and Development**, v.16, p.437-445, 2004.

DOGAN I, NUR Z. Different estrous induction methods during the non-breeding season in Kivircik ewes. **Veterinary Medicine**, v.51, p.133–138, 2006.

FREITAS VJF, SIMPLÍCIO AA. Transferência de embriões em caprinos. **Biotecnologias aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Ed. Varela, 2001.

GONZALES-BULNES A, SANTIAGO-MORENO J, GARCIA-GARCIA RM, SOUZA CJH, LOPEZ-SEBASTIAN, MCNEEILLY AS. Effect of GnRH antagonists treatment on gonadotrophin secretion, follicular development and inhibin A secretion in goats. **Theriogenology**, v.61, p.977-985, 2004.

GINTHER OJ, KOT K, WILTIBANK MC. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. **Theriogenology**, v.43, p.689-703, 1995.

GUSMÃO AL, ANDRADE MOURA JC. Transferência de embriões em caprinos e ovinos. In: XIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Angra dos Reis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.29-32, 2005.

GUSMÃO, A.L.; SILVA, J.C; QUINTELA, A.; MOURA, J.C. A.; RESENDE, J.; GORDIANO, H.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A.L.; BITTENCOURT, T. C. B. S.C.; BARBOSA, L. P. Colheita transcervical de embriões ovinos da raça Santa Inês

no Semi-árido Nordeste. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.1, p.01-10-, 2007.

HENDERSON DC, DOWNING JM, BECK NFG, et al. Oestrus synchronization in ewes: a comparison of prostaglandin F2± than salt with a progestagen pessary. **Animal Production**, v.39, p.229-233, 1984.

HINDO, E. Os pequenos ruminantes são o futuro. **O Berro**, n.96, p.70-74, nov. 2006.

IBGE. *Produção Pecuária Municipal*. Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 24 jan. 2011.

KELLY JM, KLEEMANN DO, WALKER SK. Enhanced efficiency in the production of offspring from four to eightweek old lambs. **Theriogenology**, v.63, p.1876–1890, 2005.

KOEMAN J, KEEFER CL, BALDASSARRE H, DOWNEY BR. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. **Theriogenology**, v.60, p.879-889, 2003.

KOHNO H, OKAMOTO C, IIDA K, TAKEDA T, KANEKO E, KAWASHIMA C, MIYAMOTO A, FUKUI Y. Comparison of estrus induction and subsequent fertility with two different intravaginal devices in ewes during the nonbreeding season. **Journal of Reproduction and Development**, v.51, p.805–812, 2005.

KÜHHOLZER B, MULLER S, TREUER A, SEREGI J, BESENFELDER U, BREM G. Repeated endoscopic ovum pick-up in hormonally untreated ewes: a new technique. **Theriogenology**, v.48, p.545-550, 1997.

MEIKLE A, FORSBERG M, GARÓFALO EG, CARLSSON MA, LUNDEHEIM N, RUBIANES E. Circulating gonadotrophins and follicular dynamics in anestrus ewes after treatment with estradiol-17β. **Animal Reproduction Science**, v.67, p.79-90, 2001.

MENCHACA A, RUBIANES E. New treatments associated with timed artificial insemination associated in small ruminants. **Reproduction Fertility and Development**, v.16, p.403-413, 2004.

MIES FILHO A. **Reprodução dos animais domésticos e Inseminação Artificial**. 6.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. 736p.

MOBINI S, HEATH AM, PUGH DG. Teriogenologia de ovinos e caprinos. In: PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2005. p.145-174.

NASSER LF, ADAMS GP, BO GA, MAPLETOFT RJ. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, v.40, p.713-24. 1993.

O'BRIEN J.K., BECK N.F.G, MAXWELL W.M.C AND EVANS G. Effect of hormone pre treatment of prepubertal sheep on the production and developmental capacity of

oocytes in vitro and in vivo. **Reproduction Fertility and Development**. v.9, p.625–631, 1997

OZYURTLU N, KUCUKASLAN I, CETIN Y. Characterization of Oestrous Induction Response, Oestrous Duration, Fecundity and Fertility in Awassi Ewes During the Non-breeding Season Utilizing both CIDR and Intravaginal Sponge Treatments. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.464-467, 2008.

PIERSON J, WANG B, NEVEU N. et al. Effects of repetition, interval between treatments and season on the results from laparoscopic ovum pick-up in goats. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.795-799, 2004.

PTAK G, DATTENA M, LOI P, TISCHNER M & CAPPAL P. Ovum pick-up in sheep: efficiency of *in vitro* embryo production, vitrification and birth of offspring. **Theriogenology**, v.52, p.1105-1114, 1999.

SASA A. **Efeito da nutrição na atividade cíclica reprodutiva e nas concentrações plasmáticas de melatonina em ovelhas mantidas em pastagem e submetidas ao efeito macho durante o anestro sazonal**. 2003. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.

SENEDA MM, ESPER CR, GARCIA JM, DE OLIVEIRA JA, VANTINI R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v.6, p.37-43, 2001.

SILVA BDM. **Sincronização de estro com prostaglandina F2 α versus progesterona associada à gonadotrofina coriônica equina (eCG) em ovelhas deslanadas no Distrito Federal**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SIMONETTI L, FORCADA F, RIVERA OE, CAROU N, ALBERIO RH, ABECIA JA, PALACIN I. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.227–37, 2007.

SIMPLÍCIO A A, FREITAS V J F, FONSECA J F. Biotecnologias da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.234-246, 2007.

SIRARD MA, PICARD L, DERY M. et al. The time interval between. FSH-P administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. **Theriogenology**, v.51, p.699-709, 1999.

TRALDI, A de S. Biotecnologias aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. III FEINCO - 17/03/2006. Disponível em: <<http://www.agrocentro.com.br/feinco/2006/admin/edicoes/2006/pt/congresso/download/20060814084155.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2008.

UNGERFELD R, RUBIANES E. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. **Small Ruminant Research**, v.46, p.63–66, 2002.

JUSTIFICATIVA

A produção *in vitro* de embriões na espécie ovina apresenta uma aplicação reduzida em rebanhos comerciais, contrastando com o amplo desenvolvimento verificado na espécie bovina, especialmente no rebanho brasileiro.

A utilização de protocolos hormonais certamente representa uma condição muito promissora de incrementar a PIVE em ovinos, com a perspectiva de disponibilizar um maior número de oócitos disponíveis por procedimento. No entanto o número de protocolos para a espécie ovina é mais restrito quando comparado aos bovinos, sendo possível considerar a possibilidade de adaptação de algumas estratégias farmacológicas utilizadas nos bovinos para as ovelhas.

O estrógeno, em especial o Benzoato de Estradiol, representa uma importante ferramenta hormonal em bovinos, embora haja pouquíssima informação a respeito na espécie ovina. Apesar das semelhanças reprodutivas com a espécie bovina, não há registros do uso do BE associado à progesterona no primeiro dia dos protocolos hormonais utilizados em ovinos. A perspectiva dessa associação hormonal é a mesma observada em bovinos, ou seja, induzir a regressão dos folículos em crescimento e emergência de nova onda folicular.

Outro aspecto limitante para a PIVE em ovinos é o número restrito de laboratórios especializados nesta espécie. Assim, o estabelecimento de um método eficiente de transporte de oócitos e embriões poderia contribuir para uma maior expansão desta biotécnica na espécie ovina.

HIPÓTESES

EXPERIMENTO A

O uso do Benzoato de Estradiol associado ao protocolo *One Shot* proporciona maior número de folículos e oócitos para a aspiração folicular, quando comparado com o *One Shot* isoladamente.

EXPERIMENTO B

Pode-se produzir prenhezes da espécie ovina após transportar oócitos e embriões por períodos de até 14 horas.

OBJETIVOS

EXPERIMENTO A

Objetivo Geral

Testar a eficiência do acréscimo do Benzoato de Estradiol ao protocolo *One Shot* para a aspiração folicular em ovelhas.

Objetivo Específico

Avaliar a eficiência do protocolo *One-Shot*, na presença ou ausência do Benzoato de Estradiol, quanto ao número de folículos, oócitos e a taxa de recuperação.

EXPERIMENTO B

Objetivo Geral

Utilizar o melhor protocolo obtido no Experimento I para a produção de embriões *in vitro*.

Objetivo Específico

Produzir prenhezes na espécie ovina, a partir da produção *in vitro* de embriões, considerando-se transporte de oócitos e embriões por até 14 horas.

ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

EXPRIMENTO A - AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO BENZOATO DE ESTRADIOL ASSOCIADO AO PROTOCOLO ONE SHOT NA RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS NA ESPÉCIE OVINA

EXPERIMENTO B- PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES NA ESPÉCIE OVINA: RELATO DA OBTENÇÃO DE PREENHEZ APÓS LONGOS PERÍODOS DE TRANSPORTE DE OÓCITOS E EMBRIÕES

ARTIGO A: AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO BENZOATO DE ESTRADIOL ASSOCIADO AO PROTOCOLO ONE SHOT NA RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS NA ESPÉCIE OVINA

Marilu Constantino Max^{1*}, Gustavo Martins Gomes dos Santos¹, Katia Cristina Fernandes da Silva¹, Fabiana de Andrade de Melo Sterza², Thales Ricardo R. Barreiros³, Marcelo Marcondes Seneda¹

¹Laboratório de Reprodução Animal, DCV-CCA-UEL, Londrina, PR, 96051-100

²Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, UEMS-UUA, Aquidauana, MS, Brasil

³Universidade Estadual do Norte do Paraná, UENP-CLM, Bandeirantes, Paraná. Brasil.

* Correspondência do autor: Marilu Constantino Max. Laboratório de Reprodução Animal, DCV, CCA, UEL, Londrina, PR, 86051-990, Brasil. Tel (43) 3371-4064 Fax 55 (43) 3371-4063, marilucmax@hotmail.com

Resumo

Considerando o efeito benéfico do Benzoato de Estradiol (BE) na sincronização do crescimento folicular em bovinos, o objetivo do presente trabalho foi comparar o número de folículos, oócitos e a taxa de recuperação em ovelhas submetidas ao protocolo *One Shot* com e sem o uso do BE. Ovelhas pluríparas, mestiças (1/2 sangue Texel), lanadas, não lactantes (n = 33), idade média 5 anos e com ECC $3,0 \pm 0,3$ foram divididas em 3 grupos. O grupo *One Shot* (n=10) recebeu 1,5 mg de norgestomet (Crestar®, Intervet, Holanda) no D0 e este foi mantido por 10 dias. No D8 foi administrado 0,04mg de D-cloprostenol sódico (Preloban®, Intervet, Holanda), 200 UI FSH (Pluset®, Hertape Calier, Espanha) e 300 UI de eCG (Folligon®, Intervet, Holanda). No grupo BE (n=11), a única diferença em relação ao grupo *One Shot* foi a administração de 0,6 mg de benzoato de estradiol (Estrogin®, Famavet, Brasil) em D0. No Grupo Sem Tratamento (n =12) os animais não receberam nenhum estímulo hormonal. A coleta dos oócitos foi realizada através de laparotomia 36 horas (D10) após a administração das gonadotrofinas. O meio utilizado para aspiração era composto por solução fisiológica 0,9% aquecida e acrescida de 0,05 mg/mL de heparina (Parinex®, Hipolabor, Brasil, 5000 UI/0,25ml). Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5%. Foi observado aumento ($P < 0,05$) no número de folículos aspirados no grupo *One Shot* em relação ao grupo sem estímulo hormonal e o Benzoato ($16,3 \pm 5,6$; $9,5 \pm 2,4$ e $12,1 \pm 4,1$; $P < 0,05$). As médias de oócitos recuperados e a taxa de recuperação foram superiores ($P < 0,05$) no grupo *One Shot* e no Benzoato em relação ao grupo Sem Tratamento, resultando em $14,2 \pm 9,0 / 87,1\%$ ($142/163$); $11,0 \pm 6,2 / 91,4\%$ ($122/134$) e $6,8 \pm 3,5 / 71,9\%$ ($82/114$), respectivamente. Concluímos que o *One Shot* apresentou o melhor resultado quanto ao número de folículos e oócitos obtidos, quando comparado com *One Shot* associado ao BE.

Palavras-chave: Ovinos. *One Shot*. Benzoato de Estradiol. Oócitos. Protocolos.

Abstract

Our objective was to compare the number of follicles, oocytes and the recovery rate in sheep submitted to protocol *One Shot* with or without the use of EB. Pluriparous sheep, crossbred (1 / 2 blood Texel), tossed, non-lactating (n = 33), mean age 5 years and 3.0 ± 0.3 with BCS were divided into three groups. The *One Shot* group (n = 10) received 1.5 mg of norgestomet (Crestar®, Intervet, Holland) at D0 and it was maintained for 10 days. On D8 it was administered 0.04 mg D-cloprostenol (Preloban®, Intervet, Holland), 200 IU FSH (Pluset®, Hertape Calier, Spain) and 300 IU of eCG (Folligon®, Intervet, Holland). In the EB group (n = 12), the only difference with the *One Shot* group was the administration of 0.6 mg of estradiol benzoate (Estrogin®, Famavet, Brazil) in D0. In the untreated group (n = 12) animals received no hormone stimulation. The collection of oocytes was performed by laparotomy 36 hours (D10) after administration of gonadotropins. The medium used for aspiration consisted of warmed 0,9% saline plus 0.05 mg / mL heparin (Parinex®, Hipolabor, Brazil, 5000 UI/ml ampoule 5ml). The results were subjected to analysis of variance and chi-square test with significance level of 5%. An increase was observed (P

<0.05) on the number of aspirated follicles in group *One Shot* against the group without hormonal stimulation and benzoate (16.3 ± 5.6 , 9.5 ± 2.4 and 12.1 ± 4 , 1 ; $P < 0,05$). The mean of oocytes recovered and recovery rate were higher ($P < 0.05$) in *One Shot* and benzoate as compared to group without treatment, resulting in $14.2 \pm 9.0 / 87.1\%$ (142/163), $11.0 \pm 6.2 / 91.4\%$ (122/134) and $6.8 \pm 3.5 / 71.9\%$ (82/114), respectively. We conclude that the *One Shot* had the best result on the number of follicles and oocytes, as compared with *One Shot* associated with BE.

Keywords: Ovine. *One Shot*. Estradiol Benzoate. Oocytes. Protocols.

INTRODUÇÃO

A recuperação de oócitos de fêmeas vivas, *ovum pick-up* (OPU), é largamente realizada em diversas espécies, com maior destaque para bovinos. Contudo sua exploração comercial em pequenos ruminantes é ainda bastante limitada, sendo mais utilizada na pesquisa fundamental para produção de clones e animais transgênicos produtores de proteínas recombinantes de interesse da indústria farmacêutica e na medicina humana (Baldassarre et al., 1994 e 1996; Graff et al., 1999; Baldassarre et al., 2002 e 2004b).

Na espécie ovina a produção *in vitro* de embriões (PIVE) evita problemas como a baixa taxa de ovulação e fecundação, além da alta incidência de regressão prematura de corpos lúteos. Estes aspectos são considerados responsáveis por 25% das fêmeas que não produzem embriões transferíveis nos lavados uterinos, além de possibilitar a utilização de fêmeas velhas ou animais com problemas reprodutivos (Baldassarre et al., 2004a, Baldassarre et al., 2007). O mesmo autor ressalta que é extremamente raro a produção de menos de um embrião por doadora por procedimento, na PIVE.

A média de oócitos obtidos por doadora na OPU via laparotomia e laparoscopia em pequenos ruminantes é de, respectivamente, 12 e 14. Com base nestes dados é possível notar que não há diferenças no número de oócitos obtidos entre os métodos de aspiração folicular (Ptak et al., 1999; Baldassarre et al., 2007). No entanto a laparoscopia é uma técnica menos invasiva que pode ser repetida várias vezes na mesma fêmea, entretanto é um material honeroso que requer mão-de-obra experiente na técnica (Kühholzer et al., 1997).

Apesar das vantagens apresentadas, muitos aspectos ainda precisam de aperfeiçoamento, desde os protocolos hormonais para a aspiração

folicular, técnicas de colheita dos oócitos, procedimentos *in vitro* (maturação, fecundação e cultivo) até o momento da transferência dos embriões.

Os protocolos hormonais proporcionam um significativo incremento na obtenção de oócitos e conseqüentemente embriões produzidos, quando comparado com ovelhas não tratadas (Baril, 2006). Dentre os procedimentos testados, nota-se diversas variáveis, com protocolos hormonais utilizando progestágenos, eCG e/ou FSH com diversas estratégias de utilização (Kelly et al., 2005; Berlinguer et al., 2004; Cognié et al., 2004; Koeman et al., 2003; Alberio et al., 2002; Baldassarre et al., 2002; Stangl et al., 1999; Ptak et al., 1999).

Em bovinos, o controle do folículo dominante ao início do protocolo permite a realização da aspiração folicular no começo da onda subsequente, com mais vantagens para a recuperação dos oócitos, pelo maior número de folículos de menor diâmetro (Seneda et al., 2001). Além da maior quantidade de oócitos, a qualidade dos oócitos também pode ser superior, quando a aspiração folicular é realizada na emergência da onda (Sirard et al., 1999, Castilho et al., 2007). Ainda na espécie bovina, a regressão folicular ao início do tratamento é realizada principalmente com progesterona e estradiol, os quais têm sido eficazes para promover a atresia dos folículos em desenvolvimento, propiciando a emergência de uma nova onda folicular após 3 a 5 (4,3 em média) dias, devido à ação inibitória destes dois hormônios sobre o FSH (Bó et al., 1994; Bó et al., 2006).

Em ovinos o uso do estradiol 17 beta com progesterona resultou em uma nova emergência da onda folicular aproximadamente 4 a 7 dias após (Barret et al., 2008). Já o Benzoato de Estradiol ainda não possui seu uso estabelecido, apesar ser mais acessível que o estradiol 17 beta.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a utilização do Benzoato de Estradiol em um protocolo hormonal já estabelecido (*One Shot*) na recuperação de oócitos em ovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

O experimento foi conduzido em uma propriedade localizada no município de Londrina, no norte do estado do Paraná, Brasil (23° 30' 26" de latitude sul, 51° 14' 06" de longitude oeste) no início da estação reprodutiva. O clima predominante no local é o subtropical, com concentração de chuvas no verão.

Durante o período experimental os animais foram mantidos em pastagem composta de grama Estrela Roxa (*Cynodon pletostachyus Pilger*) e grama Mato Grosso (*Paspalum notatum*), sob pastejo contínuo, com acesso a sal mineral a água *ad libitum*. À noite, os animais eram levados para o aprisco e, pela manhã, era fornecido 200 g/dia de casquinha de soja por animal.

Animais

Foram utilizadas 33 fêmeas pluríparas, mestiças (1/2 sangue Texel), lanadas, com idade média de 5 anos, não lactantes, clinicamente saudáveis e com escores de condição corporal (ECC) $3,0 \pm 0,3$ escala de 1 a 5 (Caldeira e Vaz Portugal, 1998).

Distribuição dos grupos e tratamentos

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais de acordo com o ECC. O grupo *One Shot* (n=10) recebeu um implante via auricular de 1,5 mg de norgestomet (Crestar®, Intervet, Holanda) no D0 e este foi mantido por 10 dias. No D8 foi administrado via intramuscular 0,04mg de D-cloprostenol sódico (Preloban®, Intervet, Holanda), 200 UI FSH (Pluset®, Hertape Calier, Espanha) e 300 UI de eCG (Folligon®, Intervet, Holanda) (Figura 1). No grupo Benzoato (n=11), a única diferença em relação ao grupo *One Shot* foi a administração via intramuscular de 0,6 mg de benzoato de estradiol (Estrogin®, Famavet, Brasil) no D0 (Figura 2). A dose de estrogênio foi baseada na dose utilizada em bovinos de acordo com o peso corporal (Bogacz et al., 1999). No Grupo Sem Tratamento (n =12) os animais não receberam nenhum estímulo hormonal, sendo que estes receberam administração de solução salina via intramuscular para serem manejados da mesma maneira que os animais que receberam tratamento hormonal. A coleta dos oócitos foi realizada através de laparotomia 36 horas (D10) após a administração das gonadotrofinas.

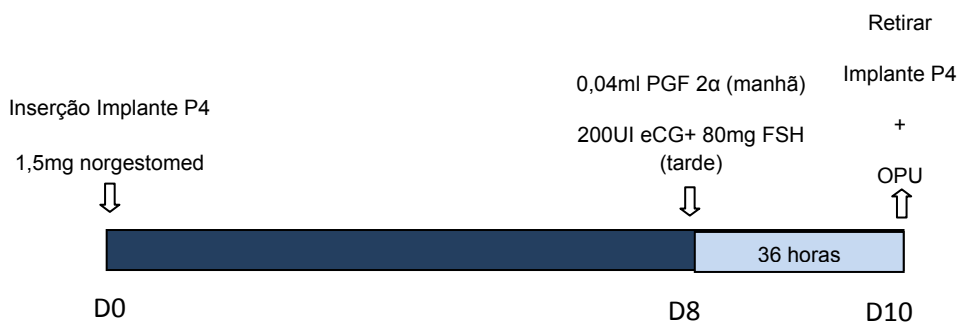


Figura 1 – Diagrama esquemático do protocolo do grupo *One Shot* administrado em ovelhas adultas e lanadas no início da estação reprodutiva.



D0

D8

D10

Figura 2 – Diagrama esquemático do protocolo do grupo Benzoato administrado em ovelhas adultas e lanadas no início da estação reprodutiva.

Descrição da técnica de laparotomia e aspiração folicular

Antes de cada procedimento, os animais foram submetidos a jejum hídrico e sólido (12 e 24 horas, respectivamente). Para realização da laparotomia, os animais eram canulados na veia jugular com cateter número 18G (Becton Dickson, Bارسil) e mantidos em fluidoterapia lenta com solução fisiológica 0,9% (1 gota a cada 2 segundos) durante todo o procedimento. O protocolo anestésico utilizado foi com Xilazina 2% (0,05 mg/kg a 0,2 mg/kg - Dorcipec®, Vallée – Brasil) via intravenosa e infiltração no local da incisão com Lidocaína 2% (Lidovet®, Bravet, Brasil). Após a administração da Xilazina os animais eram contidos em decúbito dorsal em maca cirúrgica, para realização da tricotomia e anti-sepsia com Iodo Degermante e Álcool 70°GL na região abdominal, cranialmente ao úbere. Em seguida, uma incisão retroumbilical de aproximadamente de 5 cm era feita na linha Alba. O peritônio era divulsionado e o útero assim, como os ovários, eram localizados e cuidadosamente exteriorizados. Durante todo o procedimento, os cornos uterinos e ovários eram lavados com solução fisiológica heparinizada (0,1UI/ml) aquecida, visando manter a vitalidade do órgão e prevenir futuras aderências.

Para realização da punção folicular foi utilizada uma agulha hipodérmica descartável de 30x8 mm (Becton Dickson, Brasil) conectada a um tubo cônico de 50 ml (Corning, USA), por uma mangueira de silicone de 0,8 m e diâmetro interno de 2 mm. A aspiração foi realizada a partir de uma pressão negativa correspondente à vazão de 13 ml de H₂O/min, gerada por uma bomba de infusão contínua (Nutrimat II, B-Braun, Brasil), conforme descrito por Seneda et al., (2005).

O meio utilizado para aspiração era composto por solução fisiológica acrescida de 0,05 mg/mL de heparina. Todos os folículos visíveis de ambos ovários

foram contados e aspirados. Os folículos com maior diâmetro no momento da aspiração foram classificados como dominantes, apesar de não ter sido estabelecido se os mesmos se encontravam ativos. Ao término da aspiração, o útero e os ovários foram recolocados em sua posição anatômica e em seguida foi realizada a sutura da ferida cirúrgica. A camada muscular e o subcutâneo foram suturados com fio catgut número 0 (PolySuture, Brasil) e a pele com fio Nylon número 1 (PolySuture, Brasil).

Todos os animais receberam antibiótico (Tribrisse®[®], Intervet, Holanda, Trimetropin e Sulfadiazina, 30 mg/kg/IM/SID por 5 dias) e antiinflamatório (Desflan®[®], Ouro Fino, Brasil, Flunixin Meglumine, 2.2 mg/kg/IM/SID por 5 dias). Os pontos foram retirados após 10 dias.

Descrição da técnica para busca e classificação dos oócitos

Após a aspiração de todos os folículos, era realizada a aspiração de 20 mL de meio para recuperar os oócitos que eventualmente se encontrassem no interior da agulha. Imediatamente após a aspiração, o fluido folicular recuperado era passado em um filtro de 70 micras (Emcom, Nutricell, Brasil) e subsequentemente lavado com solução salina 0,9% aquecida. Finalmente era realizada a busca e classificação dos oócitos em estereomicroscópio (Meiji Techno, EMZ, Japão). Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo Médico Veterinário.

Imediatamente após a recuperação dos oócitos, foi realizada a classificação dos mesmos de acordo com Seneda et al., 2001.

Delineamento experimental e Análise Estatística

Os parâmetros avaliados foram número de folículos, número e qualidade dos oócitos e taxa de recuperação por tratamento, no dia da aspiração folicular.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste do Qui-quadrado com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Das 33 ovelhas utilizadas no presente experimento foram aspirados 411 folículos e obteve-se 346 oócitos, resultando em uma taxa de recuperação total de 84,18%.

Foi observado aumento ($P<0,05$) no número de folículos aspirados no grupo *One Shot* em relação ao grupo Sem Tratamento Hormonal e o Benzoato (Tabela 1). A taxa de recuperação foi superior ($P<0,05$) nos grupos *One Shot* e Benzoato com relação ao grupo sem tratamento hormonal (Tabela 1). As médias de oócitos recuperados foram superiores ($P<0,05$) no grupo *One Shot* e no Benzoato em relação ao grupo Sem Tratamento Hormonal, resultando em $14,2\pm 8,0$; $10,5\pm 6,1$ e $6,1\pm 3,2$, respectivamente (Tabela 2).

Houve uma maior porcentagem de folículos dominantes, no momento da aspiração, nas fêmeas do grupo Benzoato (81%), em relação aos animais dos grupos *One Shot* (60%) e sem tratamento (58%) (Figura 3).

Tabela 1 – Média de folículos, oócitos e porcentagem da taxa de recuperação obtidos de ovelhas adultas e lanadas submetidas a protocolos hormonais pré aspiração folicular no início da estação reprodutiva.

Grupos	N	Folículos (Média±DP)	Oócitos (Média±DP)	Taxa recuperação (%)
Sem Tratamento	12	$9,5\pm 2,4^a$	$6,8\pm 3,5^a$	71,9 (82/114) ^a
Benzoato	11	$12,1\pm 4,1^a$	$11,0\pm 6,2^a$	91,4 (122/134) ^a
<i>One Shot</i>	10	$16,3\pm 5,6^b$	$14,2\pm 9,0^b$	87,1 (142/163) ^b

Valores seguidos de letras diferentes mesma coluna indicam diferença ($P<0,05$).

Tabela 2 – Número total de oócitos e média de viáveis obtidos após a aspiração folicular de ovelhas adultas e lanadas submetidas a dois protocolos hormonais pré aspiração folicular no início da estação reprodutiva.

Grupos	N	Total de Oócitos	Oócitos Viáveis
Sem Tratamento	12	82	6,1±3,2 ^a
Benzoato	11	122	10,5±6,1 ^{ab}
One Shot	10	142	14,0±8,0 ^b

Valores seguidos de letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ($P < 0,05$).

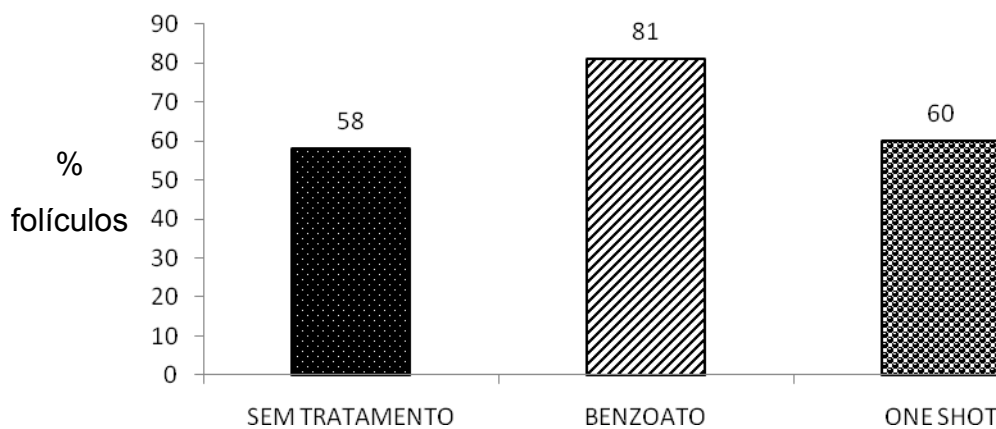


Figura 3 – Porcentagem de folículos dominantes por grupo observados no momento da aspiração folicular de ovelhas adultas e lanadas, submetidas a protocolos hormonais pré aspiração folicular no início da estação reprodutiva.

DISCUSSÃO

No presente trabalho concluiu-se que ovelhas submetidas ao protocolo hormonal *One Shot* apresentaram melhores resultados na aspiração folicular do que as tratadas com Benzoato de Estradiol mais *One Shot*. A superioridade ocorreu em número de folículos aspirados, total de oócitos obtidos, qualidade dos oócitos e taxa de recuperação.

Com relação aos folículos aspirados, obtivemos, em média, 16 folículos por doadora submetida ao *One Shot*, valor superior ao descrito por Baldassarre et al., (1996), utilizando o mesmo protocolo, cuja média obtida foi de 12 folículos por ovelha. Nos animais que não receberam estímulo hormonal, obtêve-se uma média de 9 folículos por doadora, valor superior ao obtido por Kühholzer et al. (1999), os quais obtiveram uma média de 7 folículos por animal. Em relação ao Benzoato de Estradiol, a média de folículos por animal foi de 12, valor inferior ao *One Shot* isoladamente, demonstrando uma menor eficiência no crescimento folicular quando a associação do BE foi utilizada.

A proposta do uso do Benzoato de Estradiol, em conjunto com uma fonte de progesterona presente no *One Shot*, foi buscar a mesma ação verificada em bovinos, ou seja, promover a regressão dos folículos e emergência de nova onda folicular (Bó et al., 2006). Isto poderia proporcionar uma melhor sincronia do desenvolvimento folicular, favorecendo um resultado superior quando fossem aplicados o FSH e o eCG (*One Shot*). Em bovinos, já está descrita a resposta superovulatória superior quando é iniciada exatamente no momento da emergência da onda folicular (Nasser et al., 1993, Adams et al., 1994). No entanto, a média de oócitos obtida nos animais tratados com Benzoato de Estradiol foi inferior à média das fêmeas que só receberam *One Shot*. Algumas possíveis explicações podem ser consideradas, como, por exemplo, o intervalo entre a aplicação do BE e das gonadotrofinas. Este espaço de tempo – 8 dias – pode ter sido longo, considerando-se a possibilidade de emergência de uma nova onda três a quatro dias após a aplicação de estradiol 17 beta e progesterona (Meikle et al., 2001, Barret et al., 2008). Entretanto este momento pode ter sido adequado, pois os mesmo autores

relatam a emergência de ondas foliculares até 7 dias após a administração de estrógeno e progesterona.

Um fator que deve ser levado em consideração é que o grupo tratado com BE pode ter tido uma sincronia da onda folicular satisfatória, pois houve um maior número de folículos dominantes. Este dado nos leva a crer que neste intervalo de 8 dias entre a aplicação do BE e das gonadotrofinas foi suficiente para haver a regressão e emergência de nova onda e que no momento da administração da gonadotrofinas já houvesse a divergência folicular. Neste caso o protocolo teria favorecido apenas o desenvolvimento do folículo que já expressasse receptores para as gonadotrofinas. Para programas de inseminação artificial em tempo fixo, isto poderia até ser vantajoso. No entanto, para nosso propósito de aspiração folicular, a presença do folículo dominante não era almejada. Embora tenhamos estabelecido o exame ultrassonográfico diário para poder acompanhar o desenvolvimento folicular, as dificuldades anatômicas da espécie não permitiram a acurácia dos achados.

O aspecto das ondas foliculares em ovinos mostra-se bastante complexo, pois as referências são bastante contraditórias. Há citações de 3, 4, 5 e até 6 ondas foliculares por ciclo estral (Ginther et al., 1995). A extensão do ciclo também é bastante controversa, com citações de ciclos de 9, 14, 22 e até 24 dias (Bartlewski et al., 1999). Outro aspecto crítico refere-se ao tamanho folicular durante as avaliações. Os folículos são detectados, pela maioria dos ultrassons, ao redor de 2 mm de diâmetro, sendo possível considerar que a dominância ou emergência e a atresia ocorrem em intervalos muito próximos deste tamanho (Seekallu et al., 2010). As dificuldades em acompanhar o crescimento e a regressão dos folículos são evidentes, considerando-se o reduzido tamanho dos ovários e a impossibilidade de manipulação dos mesmos.

Considerando-se a obtenção de oócitos, as ovelhas tratadas com o *One Shot* produziram 14 oócitos, média superior à descrita na literatura (Baldassarre et al., 1996), de 9,1 em fêmeas Merino/Corriedale, mas bastante aproximada à média descrita em condições brasileiras, de 14,3 oócitos a partir de ovelhas de diversas raças submetidas ao *One Shot* (Basso et al., 2008). A associação do BE ao *One Shot* resultou em número menor de oócitos – 11 – como resultado esperado, posto o menor número de folículos obtidos com o BE, em comparação ao *One Shot*. Quanto às fêmeas não tratadas, obtivemos 7 oócitos em média, valor aproximado ao

obtido de fêmeas da raça Merino – 5 – também sem estímulo hormonal (Kühholzer et al., 1997).

A taxa de recuperação dos dois grupos tratados não diferiu entre os grupos tratados, mas foi superior à dos animais sem tratamento. Em bovinos, está demonstrado a maior eficiência de recuperação folicular a partir de folículos < 4 mm (Seneda et al., 2001), em decorrência da menor pressão intra-folicular e menor viscosidade do fluido folicular, quando em comparação a folículos > 4 mm. Nas ovelhas deste experimento, as aspirações foram realizadas com laparotomia, o que não permitiu uma precisa mensuração folicular. No entanto, em ambos os grupos tratados, o número de folículos foi superior ao das fêmeas sem tratamento. Talvez os folículos estivessem com menor diâmetro nas ovelhas tratadas, mas as limitações anatômicas não permitiram uma precisa mensuração de cada folículo, inviabilizando uma analogia direta com a situação descrita para bovinos.

Em relação aos oócitos viáveis, o protocolo *One Shot* produziu o melhor resultado (98%), comparado com o BE (95%). Possivelmente a melhor sincroniza do desenvolvimento folicular e oocitário tenha ocorrido sem a presença do BE. Mas é interessante notar que os dois grupos tratados apresentaram médias superiores aos animais não tratados, sugerindo um efeito benéfico dos hormônios sobre a qualidade oocitária. A porcentagem de oócitos viáveis nos animais que receberam estímulo hormonal (95% - BE, 98% - *One Shot*) foi superior à descrita por Alberio et al. (2002), no qual obteve-se 90% de viáveis. Considerando o impacto da qualidade do oócito sobre a produção embrionária (Kelly et al., 2007), é possível admitir que o protocolo *One Shot* também poderia produzir melhores resultados na produção embrionária, aspecto corroborado pela utilização deste protocolo por importantes grupos de pesquisa (Baldassarre et al., 1996 e Basso et al., 2008).

Considerando-se os aspectos citados, torna-se bastante difícil apontar a causa exata da ineficácia do uso do BE. No entanto, os dados de número de folículos e de oócitos obtidos no estudo em questão mostraram a não necessidade de uso do BE, pois o *One Shot*, usado isoladamente, apresentou resultados superiores.

CONCLUSÃO

O BE na dose e momento em que foi associado ao *One Shot* não foi efetivo em aumentar o número de folículos e oócitos nem incrementou a taxa de recuperação de oócitos para a aspiração folicular em ovelhas.

REFERÊNCIAS

ADAMS GP, NASSER LF, BO GA, MAPLETOFT RJ, GARCIA A, DEL CAMPO MR. Superstimulatory response of ovarian follicles of wave 1 versus wave 2 in heifers. **Theriogenology**, v.42, p.1103-13, 1994.

ALBERIO R, OLIVEIRA J, ROCHE A, ALABART J, FOLCH J. Performance of a modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes. **Small Ruminant Research**, v.46, p.81-87, 2002.

BALDASSARE H, FURNUS CC, DE MATOS DG, PESSI H. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis; alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. **Theriogenology**, v.45, p.707-717, 1996.

BALDASSARRE H, AND KARATZAS CN. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.255-266, 2004a.

BALDASSARRE H, RAO KM, NEVEU N, BROCHU E, BEGIN I, BEHBOODI E, HOCKLEY DK. Laparoscopic ovum pickup followed by in vitro embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. **Reproduction Fertility and Development**, v.19, p.612-616; 2007b.

BALDASSARRE H, WANG B, KAFIDI N, KEEFER C, LAZARIS A, KARATZAS CN. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. **Theriogenology**, v.57, p.275-284, 2002.

BALDASSARRE H, WANG B, PIERSON J, NEVEU N, SNEEK L, LAPOINTE J, COTE F, KAFIDI N, KEEFER CL, LAZARIS,A, KARATZAS CN. Prepubertal propagation of transgenic cloned goats by laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production. **Cloning Stem Cells**, v.6, p.25-29, 2004b.

BALDASSARRE H. Aplicaciones prácticas de la producción de embriones *in vitro* en la especie caprina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.261-267, 2007.

BALDASSARRE H, DE MATOS DG, FURNUS CC, CASTRO TE, CABRERA FISCHER EI. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. **Animal Reproduction Science**, v.35, n.1-2, p.145-150, 1994.

BARIL G. Ovum pick-up em caprinos e ovinos. In: FREITAS VJF. **Biotecnologia da reprodução em pequenos ruminantes: produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)**. Fortaleza: Multicolor, 2006. p.30-45.

BARRET DMW, BARTLEWSKI PM, DUGGAVATHI R, DAVIES KL, HUCHKOWSKY SL, EPP T, RAWLINGS NC. Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewes: The effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, v. 69, p.827-836, 2008.

BARTLEWSKI PM, BEARD AP, COOK SJ, CHANDOLIA RK, HONARAMOOZ A, RAWLINGS NC. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.115, p.111-124, 1999.

BASSO CA, MARTINS JFP, FERREIRA CR, et al. Produção *in vitro* de embriões ovinos: aspectos da técnica de aspiração folicular e do tratamento hormonal de doadoras. **O embrião**, n.38, p.9-13, 2008.

BERLINGUER F, LEONI G, BOGLIOLO L, PINTUS PP, ROSATI I, LEDDA S, et al. FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. **Theriogenology**, v.61, p.1477-86, 2004.

BO GA, ADAMS GP, PIERSON RA, CACCIA M, TRIBULO H, MAPLETOFT RJ. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with a progestogen implant. **Theriogenology**, v.41, p.1555-1569, 1994.

BO GA, BARUSELLI PS, CHESTA PM, MARTIN CM. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, v.65, p.89-101, 2006.

BOGACZ VL, HUSTON JE, GRUM DE, DAY ML. Identification of the optimal dose of estradiol benzoate in combination with a progestin to program follicular turnover in cyclic cattle. **Journal of Animal Science**, v.77, p.124, 1999 (Abstract).

BUNGARTZ L., NIEMANN H. Assessment of the presence of dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.583-591, 1994.

CALDEIRA, R.M.; VAZ PORTUGAL, A. Condição corporal: conceitos, métodos de avaliação e interesse da sua utilização como indicador na exploração de ovinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.93, n.526, p.95-102, 1998.

CASTILHO C, ASSIS GS, GARCIA JM. Influência do diâmetro e da fase folicular sobre a competência *in vitro* de oócitos obtidos de novilhas da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.2, p.288-294, 2007.

COGNIE Y, POULIN N, LOCATELLI Y, MERMILLOD P. State-of-the-art production, conservation and transfer of invitro-produced embryos in small ruminants. **Reproduction Fertility and Development**, v.16, p.437-445, 2004.

GONZALES-BULNES A, SANTIAGO-MORENO J, GARCIA-GARCIA RM, SOUZA CJH, LOPEZ-SEBASTIAN, MCNEEILLY AS. Effect of GnRH antagonists treatment on gonadotrophin secretion, follicular development and inibin A secretion in goats. **Theriogenology**, v.61, p.977-985, 2004.

GRAFF KJ, MEINTJES M, DYER VW, PAUL JB, DENNISTON RS, ZIOMEK C, GODKE RA. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. **Theriogenology**, v.51, p.1099-1119, 1999.

GUINThER OJ, KOT K, WILTIBANK MC. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. **Theriogenology**, v. 43, p.689-703, 1995.

KELLY JM, KLEEMANN DO, WALKER SK. Enhanced efficiency in the production of offspring from four to eight week old lambs. **Theriogenology**, v.63, p.1876–1890, 2005.

KELLY JM, KLEEMANN DO, RUDIGER SR, WALKER SK. Effects of grade of oocyte-cumulus complex and the interactions between grades on the production of blastocysts in the cow, ewe and lamb. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.577-582, 2007.

KOEMAN J, KEEFER CL, BALDASSARRE H, DOWNEY BR. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. **Theriogenology**, v.60, p.879-889, 2003.

KÜHHOLZER B, MULLER S, TREUER A, SEREGI J, BESENFELDER U, BREM G. Repeated endoscopic ovum pick-up in hormonally untreated ewes: a new technique. **Theriogenology**, v.48, p.545-550, 1997.

NASSER LF, ADAMS GP, BO GA, MAPLETOFT RJ. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, v.40, p.713-724, 1993.

PIERSON J, WANG B, NEVEU N. et al. Effects of repetition, interval between treatments and season on the results from laparoscopic ovum pick-up in goats. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.795-799, 2004.

PTAK G., DATTENA M., LOI P., TISCHNER M. & CAPPAL P. Ovum pick-up in sheep: efficiency of *in vitro* embryo production, vitrification and birth of offspring. **Theriogenology**, v.52, p.1105-1114, 1999.

SEEKALLU SV, TOOSI BM, DUGGAVATHI R, BARRET DMW, DAVIES KL, WALDNER C, RAWLINGS NC. Ovarian antral follicular dynamics in sheep revisited: Comparison among estrous cycles with three or four follicular waves.

Theriogenology, v.73, p.670-680, 2010.

SENEDA M M, RUBIN K C P, BLASCHI W, LISBOA L A, PONTES J H F. Utilização de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para aspiração folicular transvaginal guiada pela ultra-sonografia. **Revista de Educação Continuada CRMV-SP**, v.8, n.2, p.168-175, 2005.

SENEDA MM, ESPER CR, GARCIA JM, DE OLIVEIRA JA, VANTINI R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science*, v.6, p.37-43, 2001.

SIRARD MA, PICARD L, DERY M. et al. The time interval between. FSH-P administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes.

Theriogenology, v.51, p.699-709, 1999.

STANGL M, KUHHLER B, BESENFELDER U, BREM G. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. **Theriogenology**, v.52, p.709-716, 1999.

ARTIGO B: *PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES NA ESPÉCIE OVINA: RELATO DA OBTENÇÃO DE PREENHEZ APÓS LONGOS PERÍODOS DE TRANSPORTE DE OÓCITOS E EMBRIÕES*

Marilu Constantino Max^{1*}, Gustavo Martins Gomes dos Santos¹, Katia Cristina Fernandes da Silva¹, Fabiana de Andrade de Melo Sterza², Marcelo Marcondes Seneda¹

¹ Laboratório de Reprodução Animal, DCV-CCA-UEL, Londrina, PR, Brasil.

² Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, UEMS-UUA, Aquidauana, MS, Brasil

Correspondência do autor: Marilu Constantino Max. Laboratório de Reprodução Animal, DCV, CCA, UEL, Londrina, PR, 86051-990, Brasil. Tel (43) 3371-4064 Fax 55 (43) 3371-4063, marilucmax@hotmail.com

Resumo

O objetivo deste trabalho foi relatar a viabilidade do transporte de oócitos e embriões ovinos produzidos *in vitro* em longas distâncias. 05 Ovelhas pluríparas Santa Inês com ECC de 3, foram submetidas ao tratamento hormonal *One Shot*. Este tratamento consistiu na inserção via intravaginal de 0,3 mg de progesterona (CIDR®, Pfizer) no D0, que foi mantida por 10 dias. Trinta e seis horas antes da aspiração folicular (D8) foi administrado 0,04 mg D-cloprostenol sódico (Preloban®, Intervet), 200 UI de FSH (Pluset®, Hertape Calier) e 300 UI de eCG (Folligon®, Intervet). A aspiração folicular foi via laparotomia. A classificação dos oócitos foi realizada sob estereomicroscópio. Os oócitos obtidos foram acondicionados em meio TCM 199 (Nutricell, Brasil), gaseificados com 5% de CO₂ e armazenados em uma incubadora de transporte (WTA, Sorocaba, São Paulo) a 38,5 °C e 5% de CO₂. Os oócitos foram transportados por via rodoviária até o laboratório de PIVE (In Vitro Brasil, Mogi Mirim/SP), por 583 km durante 14 horas. No laboratório os oócitos completaram a maturação *in vitro* e foram fecundados com a mesma partida de sêmen. O cultivo foi em meio SOF ovin. Após 4 dias de cultivo, os embriões em estágio de mórula foram submetidos ao trajeto de retorno (Mogi Mirim/SP a Londrina/PR) e enviados nas mesmas condições de transporte (km e horas). 07 receptoras, previamente preparadas, com pelo menos um CL receberam 3-4 embriões de grau I via laparotomia. Os embriões foram depositados no ápice do corno uterino ipsilateral ao CL. Foram obtidos 9,8 ± 5,7 oócitos (49 / 5), por doadora, sendo a taxa de clivagem de 100%. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultra-sonografia transretal 30 dias após a transferência dos embriões. Uma prenhez (14,3% - 07/01) foi confirmada e um cordeiro saudável nasceu após parto eutócico e período de gestação normal. Estes resultados indicam a viabilidade da PIVE em ovinos após o transporte de oócitos e embriões por longas distâncias, como recentemente demonstrado em bovinos.

Palavras-chave: Ovinos. Oócitos. Embriões. Transporte. Prenhez.

Abstract

The purpose of this study was to report the feasibility of transporting sheep oocytes and embryos *in vitro* produced over long distances. Pluriparous Santa Ines ewes (n = 5) with a body condition average of 3, were submitted to the hormone treatment named *One Shot*. This treatment consisted in a intravaginal insertion of 0.3 mg of progesteron (CIDR®, Pfizer) on D0, which was kept for 10 days. Thirty-six hours prior the follicular aspiration (D8) it was administered 0.04 mg sodic D-cloprostenol (Preloban®, Intervet), 200 IU of FSH (Pluset®, Hertape Calier) and 300 IU of eCG (Folligon®, Intervet). After the progestagen withdrawal we performed the oocyte retrieval via laparotomy. Oocyte classification was performed under stereomicroscope. The selected oocytes were loaded into TCM 199 (Nutricell, Brasil), aerated with 5% CO₂ and stored in a transport incubator (WTA, Sorocaba, São Paulo) at 38.5 °C. The oocyte transport by 583 km was carried out by road, during 14 hours, to the laboratory of *in vitro* embryo production (IVP) In Vitro Brazil (Mogi Mirim/SP), where the oocytes completed *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization (only

one ram) and then for embryo culture with SOF ovine culture medium. Embryos returned to the farm under the same transport conditions (Mogi Mirim/SP – Londrina/PR) (km and hours), and transferred into recipients 4 days after oocytes retrieval. Recipients (n = 10) previously prepared with at least one CL received by laparotomy 3-4 embryos at the morula stage. The embryos were deposited in the apex of the uterine horn ipsilateral to the CL. Pregnancy diagnosis was performed by transrectal ultrasonography 30 days after embryo transfer. It was obtained $9,8 \pm 5,7$ oocytes (49/5) per donor and the cleavage rate was 100%. Twenty five morulae grade I were transferred into 7 recipients that had among 1 and 4 CLs. One pregnancy (14,3% - 1/7) was confirmed and one healthy lamb was born after an eutocic parturition and normal pregnancy period. These results indicate the feasibility of sheep IVP after transport of oocytes and embryos for long distances, as recently demonstrated in bovine.

Keywords: Ovine. Oocytes. Embryos. Transport. Pregnancy.

INTRODUÇÃO

A recuperação de oócitos de fêmeas vivas, *ovum pick-up* (OPU), é largamente realizada em diversas espécies, com maior destaque para bovinos, contudo sua exploração em pequenos ruminantes é ainda bastante limitada (Baldassarre et al., 1994 e 1996; Graff et al., 1999).

Uma limitação consiste nas restrições anatômicas da espécie ovina, com grande dificuldade para manipulação ovariana por via transvaginal. A possibilidade de obtenção de oócitos via transvaginal foi, na espécie bovina (Pieterse, 1988), uma alavanca importante na difusão da técnica. Em pequenos ruminantes há descrição apenas para espécie caprina (Graff, 1999), mas a técnica não foi reproduzida por nenhum outro grupo, mesmo passados mais de 10 anos. Desta forma, a necessidade da abordagem cirúrgica representa um empecilho constante para uma maior difusão da obtenção de oócitos em ovinos.

Outra restrição refere-se ao estabelecimento de protocolos pré-aspiração adequados que promovam adequado controle das ondas foliculares e conseqüentemente levem ao aumento do número de oócitos obtidos. Existem dificuldades de um efetivo acompanhamento da onda de crescimento folicular em ovinos, haja visto a complexidade da dinâmica folicular nesta espécie, com relatos de até 6 ondas por ciclo e ciclos de 9 a 22 dias. Além disso suas características anatômicas dificultam o acesso dos ovários e conseqüentemente a avaliação

ultrassonográfica precisa da dinâmica folicular (Ginther et al., 1995; Bartlewski et al., 1999).

Adaptações tem sido implementadas para a superação das dificuldades anatômicas, das restrições de controle de onda, assim como de outros aspectos de campo. Mas o domínio das técnicas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* permanece restrito a pouquíssimos laboratórios, não só no Brasil, mas em todo o mundo, dificultando a expansão desta biotécnica.

No mesmo contexto é importante ressaltar que não existem protocolos eficientes de criopreservação de embriões ovinos produzidos *in vitro*. Portanto, para sobrepor as barreiras geográficas existentes entre o laboratório e o campo, outras alternativas devem ser utilizadas para permitir que a transferência de embriões frescos seja realizada. Para a espécie bovina já há a descrição de estratégias altamente eficientes para transporte de oócitos e embriões em longas distâncias entre o laboratório e o campo (Pontes et al., 2010). No entanto, o transporte de oócitos e de embriões requer condições especiais, tanto de meios, quanto temperatura e atmosfera gasosa. Para a espécie ovina, não há relatos semelhantes.

O objetivo deste trabalho foi relatar o nascimento de um cordeiro após o transporte de oócitos e embriões por longas distâncias durante o processo de produção *in vitro* de embriões.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

O experimento foi conduzido em uma propriedade localizada no norte do estado do Paraná, Brasil (23^o 30' 26" de latitude sul, 51^o 14' 06" de longitude oeste), no início da estação reprodutiva. O clima predominante no local é o subtropical, com concentração de chuvas no verão.

Durante o período experimental os animais foram mantidos em pastagem composta de grama Estrela Roxa (*Cynodon pletostachyus Pilger*) e grama Mato Grosso (*Paspalum notatum*), sob pastejo contínuo, com acesso a sal mineral a água *ad libitum*.

Animais

Foram utilizadas como doadoras 5 fêmeas pluríparas, da raça Santa Inês, com idade média de 3 anos, não lactantes, clinicamente saudáveis e com escores de condição corporal médio (ECC) $3,0 \pm 0,3$.

Como receptoras, utilizou-se 10 fêmeas pluríparas, da raça Santa Inês, clinicamente saudáveis e com ECC $3,0 \pm 0,3$.

Preparação das doadoras

Para preparação das doadoras foi realizado o protocolo pré-aspiração folicular denominado *One Shot* (Baldassarre et al., 2007). As doadoras receberam via intravaginal 0,3 mg de progesterona (CIDR®, Pfizer, Holanda) no D0 e este foi mantido por 10 dias. No D8 foi administrado via intramuscular 0,04mg de D-cloprostenol sódico (Preloban®, Intervet, Holanda), 200 UI FSH (Pluset®, Hertape Calier, Espanha) e 300 UI de eCG (Folligon®, Intervet, Holanda) (Figura 1). A coleta dos oócitos foi realizada através de laparotomia 36 horas (D10) após a administração das gonadotrofinas.

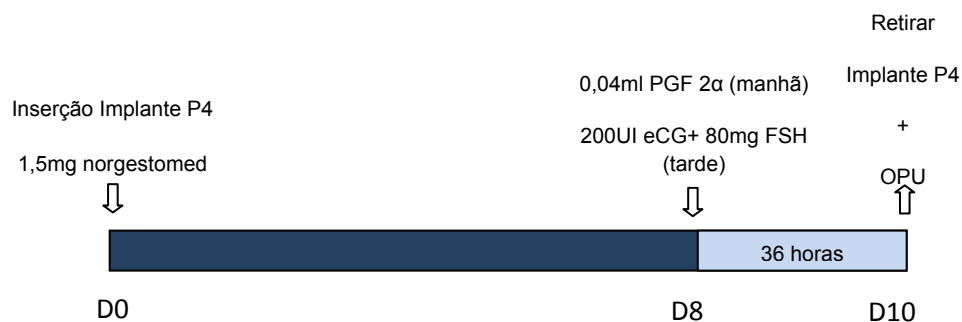


Figura 1 – Diagrama esquemático do protocolo *One Shot* administrado nas doadoras Santa Inês no início da estação reprodutiva.

Preparação das receptoras

As receptoras receberam via auricular subcutânea 1,5 mg de norgestomed (Crestar®, Intervet, Holanda) no D0 (mesmo dia em que as doadoras receberam o dispositivo) que permaneceu nos animais por 9 dias (D9) (Figura 2). Imediatamente após a retirada do progestágeno as receptoras receberam 400 UI de eCG (Folligon®, Intervet, Holanda) e 0,04 mg de D-cloprostenol sódico (Preloban®, Intervet, Holanda). No D13, as receptoras foram avaliadas quanto a presença de corpo lúteo por meio de laparotomia e aquelas que apresentaram pelo menos 1 corpo lúteo receberam 3 ou 4 mórulas da grau I no ápice do corno uterino ipsilateral ao CL. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a transferência dos embriões.

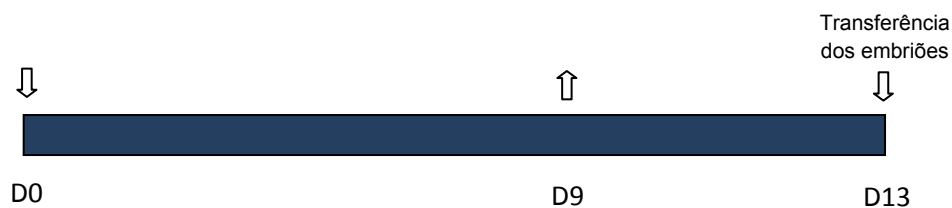


Figura 2 – Diagrama esquemático do protocolo de sincronização realizados nas receptoras Santa Inês para transferência dos embriões no início da estação reprodutiva.

Descrição da técnica de aspiração folicular via laparotomia

Antes de cada procedimento, os animais foram submetidos a jejum hídrico e sólido (12 e 24 horas, respectivamente). Para realização da laparotomia, os animais eram canulados na veia jugular com cateter número 18G (Becton Dickson,

Barsil) e mantidos em fluidoterapia lenta com solução fisiológica 0,9% (1 gota a cada 2 segundos) durante todo o procedimento. O protocolo anestésico utilizado foi com Xilazina 2% (0,05 mg/kg a 0,2 mg/kg - Dorcipec®, Vallée – Brasil) via intravenosa e infiltração no local da incisão com Lidocaína 2% (Lidovet®, Bravet, Brasil). Após a administração da Xilazina os animais eram contidos em decúbito dorsal em maca cirúrgica, para realização da tricotomia e anti-sepsia com Iodo Degermante e Álcool 70°GL na região abdominal, cranialmente ao úbere. Em seguida, uma incisão retroumbilical de aproximadamente de 5 cm era feita na linha Alba. O peritônio era divulsionado e o útero assim, como os ovários, eram localizados e cuidadosamente exteriorizados. Durante todo o procedimento, os cornos uterinos e ovários eram lavados com solução fisiológica heparinizada (0,1UI/ml) aquecida, visando manter a vitalidade do órgão e prevenir possíveis aderências.

Para realização da punção folicular foi utilizada uma agulha hipodérmica descartável de 30x8 mm (Becton Dickson, Brasil) conectada a um tubo cônico de 50 ml (Corning, USA), por uma mangueira de silicone de 0,8 m e diâmetro interno de 2 mm. A aspiração foi realizada a partir de uma pressão negativa correspondente à vazão de 13 ml de H₂O/min, gerada por uma bomba de infusão contínua (Nutrimat II, B-Braun, Brasil), conforme descrito por Seneda et al., (2005).

O meio utilizado para aspiração era composto por PBS (Nutricell, Brasil) acrescida de 0.05 mg/mL de heparina. Todos os folículos visíveis de ambos ovários foram contados e aspirados. Ao término da aspiração, o útero e os ovários foram recolocados em sua posição anatômica e em seguida foi realizada a sutura da ferida cirúrgica. A camada muscular e o subcutâneo foram suturados com fio catgut número 0 (PolySuture, Brasil) e a pele com fio Nylon número 1 (PolySuture, Brasil).

Todos os animais receberam antibiótico (Tribrissem®, Intervet, Holanda, Trimetropin e Sulfadiazina, 30 mg/kg/IM/SID por 5 dias) e antiinflamatório (Desflan®, Ouro Fino, Brasil, Flunixin Meglumine, 2.2 mg/kg/IM/SID por 5 dias). Os pontos foram retirados com 10 dias.

Manipulação e classificação dos oócitos

O líquido aspirado foi avaliado sob estereomicroscópio (Meiji Techno, EMZ, Japão) e os oócitos classificados segundo Seneda et al (2001). Os

oócitos obtidos foram colocados em criotubos devidamente identificados contendo TCM 199 (Nutricell, Brasil) e óleo mineral previamente estabilizado em incubadora à 38,5 C e 5% de CO₂. Antes de colocar o material na incubadora de transporte (WTA, Sorocaba, São Paulo) foi feita a injeção de CO₂ nos criotubos, que eram então fechados e envolvidos com parafilme. A incubadora de transporte apresentava um ambiente de 38,5 C e 5% de CO₂, sendo a autonomia da bateria de 24 horas.

Transporte dos oócitos

Os oócitos devidamente acondicionados na incubadora de transporte, foram transportados via rodoviária (em ônibus) de Londrina - Paraná para Mogi Mirim – São Paulo, totalizando 583 Km e 14 horas de viagem.

Procedimentos no Laboratório de PIVE

No laboratório (In Vitro Brasil), os oócitos foram novamente avaliados e classificados e após completar o período de 24 de maturação foram fecundados com a mesma partida de sêmen de um único reprodutor da raça Santa Inês. A preparação dos espermatozoides foi feita em gradiente Percoll e a fecundação em IVF-TALP por período de 18 horas. O cultivo foi realizado em um meio adaptado para ovinos, denominado SOF *ovine*. Após 24 horas de cultivo as estruturas foram colocadas em criotubo em meio de cultivo sob óleo mineral. Os criotubos foram devidamente identificados e colocados na incubadora de transporte a 38,5 C e 5% CO₂ e enviados para Londrina – PR nas mesmas condições (km e horas). Após a chegada no destino os criotubos foram gaseificados a cada 12 horas até o momento da transferência dos embriões.

Descrição da técnica de transferência dos embriões

A transferência dos embriões foi feita em receptoras devidamente preparadas hormonalmente (Figura 2). A laparotomia foi realizada nas 10 receptoras tratadas, mas somente as que apresentaram pelo menos um corpo lúteo (n = 7) receberam os embriões.

Os embriões foram avaliados sob estereomicroscópio (Meiji Techno, EMZ, Japão) e envasados em palhetas de 0,25 mL (3 ou 4 embriões por palheta). Como o número de embriões foi superior ao número de receptoras disponíveis, foi possível a transferência dos embriões de melhor qualidade.

Antes de cada procedimento, os animais foram submetidos a jejum hídrico e sólido (12 e 24 horas, respectivamente). Para realização da laparotomia, os animais eram canulados na veia jugular com cateter número 18G (Becton Dickson, Barsil) e mantidos em fluidoterapia lenta com solução fisiológica 0,9% (1 gota a cada 2 segundos) durante todo o procedimento. O protocolo anestésico utilizado foi com Xilazina 2% (0,05 mg/kg a 0,2 mg/kg - Dorcipec®, Vallée – Brasil) via intravenosa e infiltração no local da incisão com Lidocaína 2% (Lidovet®, Bravet, Brasil). Após a administração da Xilazina os animais eram contidos em decúbito dorsal em maca cirúrgica, para realização da tricotomia e anti-sepsia com Iodo Degermante e Álcool 70°GL na região abdominal, cranialmente ao úbere. Em seguida, uma incisão retroumbilical de aproximadamente de 5 cm era feita na linha Alba. O peritônio era divulsionado e o útero assim, como os ovários, eram localizados e cuidadosamente exteriorizados. Durante todo o procedimento, os cornos uterinos e ovários eram lavados com solução fisiológica heparinizada (0,1UI/ml) aquecida, visando manter a vitalidade do órgão e prevenir possíveis aderências.

A transferência foi feita no ápice do corno uterino ipsilateral ao (s) corpo (s) lúteo (s). A incisão foi feita com uma ponteira de micropipetador (ponteira de 100 µl – amarela). Em seguida o auxiliar fez a apresentação do útero e a palheta foi posicionada na incisão, sendo o êmbolo de um aplicador de inseminação artificial utilizado para empurrar o conteúdo da palheta cranialmente no interior do útero.

Ao término da transferência, o útero foi recolocado em sua posição anatômica e em seguida foi realizada a sutura da ferida cirúrgica. A camada muscular e o subcutâneo foram suturados com fio categut número 0 (PolySuture, Brasil) e a pele com fio Nylon número 1 (PolySuture, Brasil).

Todos os animais receberam antibiótico (Tribrissem®, Intervet, Holanda, Trimetropin e Sulfadiazina, 30 mg/kg/IM/SID por 5 dias) e antiinflamatório (Desflan®, Ouro Fino, Brasil, Flunexin Meglumine, 2.2 mg/kg/IM/SID por 5 dias). Os pontos da pele foram retirados com 10 dias.

RESULTADOS

A aspiração das 5 doadoras resultou em 49 oócitos, sendo aproximadamente 10 oócitos por doadora de qualidade variável (Tabela 1). Todos os oócitos coletados foram enviados ao laboratório em Mogi Mirim – São Paulo. 100% das estruturas foram fecundadas, tornando-se embriões em estágio de mórula no quarto dia após a colheita dos oócitos (Tabela 1). Considerando-se que o número de receptoras disponíveis foi inferior ao número de embriões produzidos, somente 25 embriões foram transferidos em receptoras que apresentaram de um a quatro corpos lúteos. Apenas uma prenhez (14,3%) foi confirmada em uma receptora que continha 4 corpos lúteos. Um cordeiro saudável nasceu após parto normal e período de gestação compatível com a espécie.

Tabela 1 – Média e qualidade de oócitos recuperados e embriões obtidos por doadora após a aspiração folicular por laparotomia e produção de embriões ovinos *in vitro*.

	Média de oócitos ± DP	Média de mórulas ± DP
Grau 1	4,5 ± 2,9	5,4 ± 3,1
Grau 2	1,6 ± 0,9	2,4 ± 1,67
Grau 3	1,8 ± 0,8	-
Desnudos	1,8 ± 1,2	-
Total	9,8 ± 5,7	9,8± 3

* Todos os oócitos obtidos foram cultivados em conjunto, sem que fossem separados por categoria.

DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou a colheita de $9,8 \pm 5,7$ oócitos por doadora utilizando o método *One Shot* como protocolo pré-aspiração. Baldassarre

(2004) obteve a média de 13,4 oócitos por doadora no Canadá. No Brasil, Basso et al (2008) relataram média de 14,3 oócitos por doadora. Dados de campo informados por comunicação pessoal do mesmo grupo demonstraram que ovelhas da raça Santa Inês (n = 350), raça utilizada nesse trabalho, produzem em média 10 oócitos por doadora, produção compatível com a apresentada nesse trabalho. Na literatura não foi encontrado trabalho científico comparando a produção de oócitos entre as raças ovinas, mas acredita-se que existam diferenças relevantes nesse sentido.

O método de colheita de oócitos e transferência dos embriões eleito nesse trabalho foi a laparotomia. A laparoscopia foi descrita como o método mais indicado para aspiração folicular visto que é um procedimento pouco traumático, permitindo a realização de repetidas sessões de aspiração folicular com poucos riscos de prejuízo futuro da fertilidade da doadora (Baldassarre *et al.*, 1996; Stangl *et al.*, 1999). No entanto essa técnica apresenta algumas desvantagens, como os altos custos em equipamentos e a necessidade de treinamento, tanto do operador quanto do auxiliar para efetivamente minimizar trauma e tempo cirúrgico (Tabet, 2007). Nesse sentido a laparotomia apresenta-se como método alternativo. Li et al (2008) demonstraram não haver diferença significativa na taxa de prenhez de embriões produzidos *in vitro* e transferidos por laparoscopia ou laparotomia.

No presente caso foram obtidos oócitos de diferentes qualidades, graus I, II e III, bem como desnudos e degenerados. Todos os oócitos foram enviados ao laboratório para fecundação e cultivo. Surpreendentemente, 100% deles clivaram alcançando o estágio de mórula no terceiro dia após a fecundação. As taxas de clivagem descritas na literatura variam de 49,8 a 79,7% (Garcia-Garcia et al., 2007; Baldassare et al, 1996). Dados de campo da empresa In Vitro Brasil (n = 601) demonstram taxa de clivagem de 86%. Kelly et al (2007) afirmaram que oócitos de maior qualidade apresentam maior eficiência na produção de blastocistos, mas como em ovinos o número de oócitos de grau I é inferior a outras espécies, a pressão de seleção torna-se também inferior. Considerando que a transferência precoce dos embriões não permite a avaliação da taxa de blastocistos e ainda que apesar da alta taxa de clivagem uma baixa taxa de prenhez foi obtida no presente caso, especula-se que um alto grau de fragmentação citoplasmática tenha ocorrido, talvez provocado pelo longo transporte dos oócitos e em seguida dos embriões. É importante ressaltar que a avaliação da estruturas foi feita tanto pela equipe de

laboratório, como pela equipe de campo, ambas com experiência na classificação de oócitos.

A taxa de prenhez obtida nesse caso, 14,3% (1\7) foi um índice muito abaixo do que se considera adequado para um programa comercial de produção de embriões. Esse resultado, 0.2 cordeiros nascidos por doadora, foi inferior ao demonstrado por Traldi em 2009 (1,6 cordeiros nascidos por doadora) e Basso et al em 2008 (1,2 prenhezes por doadora). É preciso ressaltar que os métodos utilizados foram diferentes entre os trabalhos apresentados. Traldi (2009) afirmou que em ovinos ocorre com frequência fragmentação citoplasmática do oócito que pode ser confundida com clivagem, no entanto a taxa de blastocistos obtida a partir dessas estruturas é muito baixa após 7 a 8 dias de cultivo. Alguns autores (Reggio et al, 2001; Baldassare et al 2003; Traldi et al, 2009) citaram que a realização da transferência de embriões 2 a 3 dias após a fecundação na região tubárica poderia reduzir o índice de anomalias do desenvolvimento de produtos da PIVE. Nesse caso a transferência dos embriões foi realizada 72 horas após a fecundação no ápice do corno uterino. A transferência de embriões tão precocemente pode permitir que embriões de qualidade inferior sejam transferidos, visto que não é possível saber como seria o seu desenvolvimento até o estágio de blastocisto.

O transporte de oócitos e embriões em meios específicos durante longos períodos é uma alternativa que pode ser utilizada para transpor as barreiras geográficas entre laboratórios e o campo e também as dificuldades de criopreservação dos embriões produzidos *in vitro*. Em bovinos, utilizando a mesma técnica, foi possível obter taxas de prenhez compatível com a espécie, 35 a 40% (Pontes et al, 2010).

O presente trabalho mostrou que o transporte de oócitos e embriões em longas distâncias é possível em ovinos, no entanto os resultados devem ser melhorados para que a PIVE torne-se uma alternativa mais atrativa e viável para a multiplicação da genética ovina.

CONCLUSÃO

O transporte de oócitos e embriões da espécie ovina por até 14 horas mostrou-se viável para a obtenção de prenhez e nascimento de cordeiro viável a partir da produção *in vitro* de embriões.

REFERÊNCIAS

BALDASSARRE H, AND KARATZAS CN. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science**, v.82–83, p.255–266, 2004.

BALDASSARRE H, DE MATOS DG, FURNUS CC, CASTRO TE, CABRERA FISCHER EI. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. **Animal Reproduction Science**, v.35, n.1-2, p.145-150, 1994.

BALDASSARRE H, FUMUS CC, MATOS DG, et al. *In Vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. **Theriogenology**, v.45, p.707-717, 1996.

BALDASSARRE H, WANG B, KAFIDI N, et al. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of *in vitro* produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. **Theriogenology**, v.59, p.831-839, 2003.

BARTLEWSKI PM, BEARD AP, COOK SJ, CHANDOLIA RK, HONARAMOOZ A, RAWLINGS NC. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.115, p. 111-124, 1999.

BASSO, C.A.; MARTINS, J.F.P.; FERREIRA, C.R. et al. Produção *in vitro* de embriões ovinos: aspectos da técnica de aspiração folicular e do tratamento hormonal de doadoras. **O embrião**, n.38, p.9-13, 2008.

GARCIA-GARCIA, R.M.; DOMINGUEZ, V.; GONZALEZ-BULNES, A. et al. Effect of embryo developmental stage and culture conditions on number and quality of ovine *in vitro* produced blastocysts. **Zygote**, v.14, p.181-187, 2006.

GRAFF KJ, MEINTJES M, DYER VW, PAUL JB, DENNISTON RS, ZIOMEK C, GODKE RA. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. **Theriogenology**, v.51, p.1099-1119, 1999.

GUINTEHER OJ, KOT K, WILTIBANK MC. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the estrous cycle in ewes. **Theriogenology**, v. 43, p.689-703, 1995.

KELLY JM, KLEEMANN DO, RUDIGER SR, WALKER SK. Effects of grade of oocyte-cumulus complex and the interactions between grades on the production of

blastocysts in the cow, ewe and lamb. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, n. 6, p.577-582, 2007.

LI QY, GUAN H, HOU J, AN XR AND CHEN YF. Technical note: Transfer of ovine embryos through a simplified mini-laparotomy technique. **Journal of Animal Science**, v.86, p.3224-3227, 2008.

PIETERSE MC, KAPPEN KA, KRUIP AM, TAVERNE AM. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v.30, n.1, p.751-762, 1988.

PONTES JH, SILVA KC, BASSO AC, RIGO AG, FERREIRA CR, SANTOS GM, SANCHES BV, PORCIONATO JP, VIEIRA PH, FAIFER FS, STERZA FA, SCHENK JL, SENEDA MM. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v.74, n. 8, p.1349-1355, 2010.

REGGIO, B.C.; JAMES, A.N.; GREEN, H.L. et al. Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: oocytes derived from both follicle-stimulating hormonestimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1528-1533, 2001.

SENEDA MM, ESPER CR, GARCIA JM, OLIVEIRA JA, VANTINI R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v.67, p.37-43, 2001.

STANGL, M.; KUH HOLZER, B.; BESENFELDER, U.; BREM, G. Repeated endoscopic ovum pick up in sheep. **Theriogenology**; v. 521, p. 709-716, 1999.

TABET, A.F. **Transferência intratubárica videolaparoscópica de embriões ovinos fertilizados *in vitro***. 73 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2007.

TRALDI A de S. Produção *in vitro* de embriões de ovinos: uma visão crítica do método e de seu resultado a campo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.301-306, 2009.