

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

MUITAS CAMADAS DO CUMULUS E SUA INFLUÊNCIA NA TAXA DE RECUPERAÇÃO DE ESTRUTURAS NA TIFOI

André Bianchini Covre, Rudiery Lauson de Paula Reis, José de Oliveira
Carvalho Neto, Michele Ricieri Bastos

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, S/N Guararema, 29500-000 - Alegre - ES,
Brasil, andrebcvet@gmail.com, rudieryvet@gmail.com, joseocneto@hotmail.com,
michelericieribastos@gmail.com

Resumo

Atualmente, existem duas grandes biotecnologias da reprodução quanto à produção de embriões bovinos, sendo: a produção *in vivo* por meio da superovulação (SOV-TE) e a produção *in vitro*, a partir da PIVE. Ambas apresentam pontos positivos e negativos. A SOV-TE destaca-se por permitir embriões de melhor qualidade, mas, demanda tempo mínimo de 40 dias entre os protocolos, dificultando uso em larga escala. A PIVE detém facilidade em larga escala, com coletas semanais de oócitos, no entanto, a qualidade embrionária é inferior quando comparada à *in vivo*. Surge a Transferência Intrafolicular de Oócitos Imaturos (TIFOI) como terceira opção sendo *in vivo*, apresentando potencial para viabilizar a produção de embriões amplamente, com todas as etapas dentro da fazenda. Objetiva-se neste estudo avaliar se a injeção de células do cumulus (CCs) com muitas camadas influenciam na taxa de recuperação de estruturas após a TIFOI em fêmeas da raça Girolando. Foram utilizadas 09 fêmeas, injetando oócitos com muitas camadas de CCs (≥ 4), com taxa de recuperação de 24% (39 estruturas). As taxas de recuperação são variáveis, mesmo com a utilização de muitas camadas do cumulus.

Palavras-chave: Complexo cumulus-oophorus (CCOs). Transferência Intrafolicular de Oócitos Imaturos. Recuperação de Estruturas.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Medicina Veterinária.

Introdução

É sabido que para aumentar a produtividade do rebanho brasileiro é essencial que se tenha inserção de tecnologias nos sistemas produtivos, incluindo tecnologias de reprodução assistida, tanto para sistemas de produção de corte como de leite.

Dentre as biotecnologias da reprodução temos a inseminação artificial (IA), a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a produção *in vivo* de embriões bovinos com superestimulação ovariana (SOV-TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) associada à aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU). Todas elas estão disponíveis comercialmente para otimizar o melhoramento genético do rebanho e consequentemente aumentar a produtividade (BARUSELLI *et al.*, 2007).

No Brasil, estas tecnologias são utilizadas por quase todo o território nacional, sendo que em 2019 um total aproximado de 304.269 embriões (VIANA, 2021). Destes, 285.552 (93,8%) embriões foram produzidos *in vitro* e 18.717 (6,2%) *in vivo*. Isto comprova o grande potencial que o país possui para o uso das biotecnologias da reprodução e a demanda pela multiplicação mais rápida e eficiente de animais com um potencial genético (SPRICIGO e DODE, 2016).

Pensando nestas vantagens e desvantagens Spricigo *et al.* (2016) descreveu uma nova biotecnologia da reprodução assistida, que une as vantagens da SOV-TE e da PIVE, a qual denomina-se Transferência Intrafolicular de Oócitos Imaturos (TIFOI). A TIFOI permite a produção *in vivo* de embriões, sem necessidade de utilizar protocolos hormonais a base de FSH na doadora e obter embriões de melhor qualidade, quando comparada à PIVE. Além disto, elimina alguns fatores limitantes da PIVE, como, a necessidade de uma estrutura de laboratório para produção de embrião ou grandes distâncias de transportes dos CCOs e embrião entre a fazenda e o laboratório.

A produção de embriões bovinos após injeção de oócitos em um folículo pré ovulatório, seguida por inseminação artificial foi primeiramente relatada por Bergfelt *et al.* (1998).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Desta forma, objetivou-se com este estudo avaliar se a injeção intrafolicular utilizando CCOs com maior quantidade de células do cumulus pode influenciar na taxa de recuperação de estruturas após a TIFOI.

Metodologia

Todos os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pelo comitê de ética de uso animal (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) – “Transferência Intrafolicular de Oócitos Imaturos (TIFOI): otimização e validação da técnica em gado de leite” registrada sob o N.º 010/2020. O experimento foi realizado na Área Experimental da UFES, com suporte laboratorial do Laboratório de Reprodução Animal, situado no Hospital Veterinário, CCAE-UFES, campus de Alegre.

Foram selecionadas 09 vacas mestiças Girolando, não lactantes, com escore de condição corporal que variava de 3,5 a 4,5 sob escala 1-5, e peso vivo de 445 ± 97 kgs. Os animais eram mantidos em piquetes com capim *Brachiaria decumbens*, em sistema semi-intensivo, com suplementação de ração proteinada e silagem de milho, com sal mineral e água *ad libitum*.

Os oócitos foram obtidos a partir de Ovários de fêmeas bovinas coletados em abatedouro ABAV-Abatedouro Atílio Vivacqua Ltda. – ES, CNPJ 02.838.996/0001-34. Os ovários foram coletados e transportados ao laboratório a 37°C, imersos em solução salina (0,9% NaCl). Foram aspirados os folículos que apresentavam tamanho de 3 a 8 mm, com uso de seringa de 10 mL e agulha 18G. A partir disso, eram depositados em tubos cônicos de 15 mL. Então, os complexos cumulus oócitos (CCOs) foram rastreados e classificados de 1-4 de acordo com sua morfologia citoplasmática e número de camadas de células do cumulus.

Para obter-se um folículo pré-ovulatório com diâmetro ≥ 10 mm as fêmeas bovinas foram submetidas a um protocolo de sincronização de estro. Este, teve início com a inserção do dispositivo intravaginal de progesterona (P4; Sincrogest 1g, Ourofino, Cravinhos – SP) associado a injeção (i.m.) de 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE; Sincrodiol, Ourofino, Cravinhos – SP). Após 8 dias fez-se a remoção do implante de P4, seguido da aplicação de 2 mL (i.m.) de Prostaglandina F2 α (PgF2 α ; 0,5 mg de Cloprostenol Sódico, Ourofino, Cravinhos – SP). A indução da ovulação foi realizada com o uso de 1 mg de BE no dia 9 (D9). No dia 10 as vacas foram avaliadas com ultrassom de 7,5 MHz (Mindray DP 2200, Shenzhen, China).

Quanto a injeção intrafolicular de oócitos imaturos (TIFOI) foi utilizado neste grupo apenas oócitos que apresentavam maiores quantidades de células do cumulus, ou seja, CCOs grau 1. O procedimento de TIFOI foi realizado de acordo como descrito por Spricigo *et al.* (2016), com modificações.

Os animais foram alocados em bretes individuais, consequentemente foram higienizados e anestesiados a partir de epidural baixa, utilizando aproximadamente 3 mL de Lidocaína.

A TIFOI foi realizada com um transdutor micro-convexo, acoplado a uma guia transvaginal (WTA, Brasil). A guia continha um mandril montado em um sistema fechado, possuindo em uma extremidade uma seringa de insulina, e na extremidade oposta, uma agulha 27G.

Os CCOs foram alocados por meio de pressão negativa dentro da agulha de injeção em 60 μ L meio TCM 199 acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). A guia foi posicionada no fórnix vaginal, ipsilateral ao ovário contendo o folículo dominante. A agulha perfura então o fórnix e a parede do folículo dominante, injetando então, o volume da agulha que continha os CCOs.

Sete dias após TIFOI as fêmeas ovuladoras foram submetidas à lavagem uterina para colheita dos embriões. Foi realizada anestesia epidural com uso de lidocaína e posteriormente higienização da região perineal. A técnica de colheita realizada foi não cirúrgica, através da lavagem uterina com 1 litro de *Dulbecco Buffered Saline* (DPBS) por animal, utilizando Sonda de Foley (No. 18, Rusch, EUA), acoplada a um Sistema em "Y". O lavado foi recolhido em filtro 75 μ m (WTA, Brasil) e transportado ao laboratório, onde as estruturas foram rastreadas e avaliadas. Após o final da lavagem uterina, foi realizada a aplicação de 2 mL de Prostaglandina, para promover a luteólise dos CLs ds vacas ovuladoras.

Resultados

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Dos 9 protocolos de sincronização da ovulação realizados nos 9 animais, foi comprovada a ovulação de 8 animais (88,8%), sendo que, o animal em que não apresentou ovulação foi removido do estudo. Os demais dados descritivos são encontrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Diâmetro médio do FD, taxa de ovulação, número de CCOs injetados e taxas de recuperação de estruturas após TIFOI realizada utilizando muitas células do cumulus.

Grupo	Média de Diâmetro FD - D10 mm	Média de Ovulação %	Animais com Recuperação n (%)	Animais com Recuperação -1 n (%)	Total de CCO's Injetados n	Média de CCO's Injetados n	Estruturas Recuperadas n	Taxa de Recuperação de Estruturas %
Muitas CCs	13,76±0,69	88,8 (8/9)	6 (75,0)	5 (62,5)	163	20,38±0,43	39	24%

Fonte: os autores.

As informações descritivas da classificação das estruturas recuperadas, está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Estruturas totais recuperadas e a classificação das estruturas.

Grupo	Classificação das Estruturas				
	Estruturas Coletadas	ZP	NF	Clivados	Degenerados
	n	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Muitas CCs	39	3 (7,6)	24 (61,5)	12 (30,7)	12 (30,7)

Fonte: os autores.

Discussão

TIFOI surge como uma alternativa para a produção *in vivo* de embriões bovinos. Entretanto, apesar da eficácia já comprovada, esta biotecnologia ainda apresenta baixa eficiência, com taxa de embriões viáveis recuperados variando de 12 a 27% (KASSENS *et al.*, 2015; SPRICIGO *et al.*, 2016; VIEIRA, 2022) em relação ao número total de CCO's injetados. Parte destes baixos resultados pode estar ligado a problemas na captação pelas fímbrias do infundíbulo do conjunto de CCO's injetados no folículo pré ovulatório no momento da TIFOI. Acredita-se que, semelhantemente à maturação *in vitro* (YOKOO; SAKO, 2004), possa estar ocorrendo a formação de um aglomerado dos vários CCOs injetados após sofrerem maturação oocitária com subsequente expansão das células do cumulus, fazendo com que ocorra essa adesão entre os CCOs. Com base nesta hipótese decidiu-se avaliar, neste estudo, se a quantidade de células do cumulus (CCs) presente nos oócitos injetados poderia influenciar na taxa de recuperação após TIFOI, tanto por uma possível influência na capacidade do folículo ovulatório em expulsar o aglomerado de oócitos, como também por uma possível influência na capacidade das fímbrias do infundíbulo em captar os aglomerados de CCOs na sua totalidade.

O processo de captação do oócito ocorre mediante a expansão das células do cumulus, quando uma elevada quantia de glicosaminoglicanos (GAG's) são sintetizados e secretados, estas moléculas interagem com alguns componentes específicos da matriz, formando uma rede de matrizes viscoelásticas no espaço extracelular, facilitando o desprendimento do CCO da parede folicular, o qual é capturado pelas fímbrias tubáricas (CHEN *et al.*, 1993; HESS *et al.*, 1999; TSAFRIRI, 1995). Na tuba uterina, transportado pelo batimento ciliar e pela musculatura lisa, o CCO permanece ligado ao epitélio por um período de tempo variável (COY *et al.*, 2012). A taxa de recuperação encontrada neste estudo pode estar relacionada com a quantidade de expansão, pois sabe-se que uma maior quantidade de células do cumulus proporciona uma melhor qualidade, facilitando a captura do oócito pelas fímbrias do infundíbulo.

Um outro ponto que, acredita-se, que pode ser crítico para o sucesso da TIFOI é a necessidade de manipulação do ovário contendo o folículo pré ovulatório, horas antes da ovulação. Não se sabe o

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

quanto essa manipulação pode ou não comprometer o correto posicionamento das fímbrias do infundíbulo da tuba uterina em relação ao ovário. Caso essa manipulação possa causar mudança nas fímbrias que recobrem o ovário, a captação poderá ser negativamente impactada e refletir em uma menor taxa de recuperação após a TIFOI.

Quanto a baixa taxa de recuperação de estruturas, é relatada por diferentes trabalhos sendo altamente variável, de 2,6% (VIEIRA, 2022) a 17,3% (HOELKER *et al.*, 2017). Além disso, observa-se que a quantidade de não fecundados e embriões degenerados foi de 24 estruturas (61,5%) e 12 (30,7%). Isto, pode ser relacionado a falha na aquisição de competência dos oócitos durante a maturação e/ou devido ao ambiente tubárico ser inadequado para que ocorram os processos de fecundação e desenvolvimento embrionário inicial.

Acredita-se também, que a presença de vários CCOs no interior de um folículo que, fisiologicamente, abrigaria apenas 01 CCO, poderia provocar uma modificação dos componentes do fluido folicular. Desta forma, apesar de estudos indicarem que o tempo de permanência dos CCOs no interior do folículo seja suficiente para promover a expansão das CC e a maturação nuclear deste oócito, por verificação de seu estágio em metáfase II, é possível que não ocorram outras alterações importantes, especialmente ligadas a maturação citoplasmática ou molecular. Desta forma, o processo de fecundação e principalmente do desenvolvimento embrionário inicial, pode ser comprometida.

Conclusão

Os resultados indicam que as taxas de recuperações de estruturas na TIFOI continuam voláteis mesmo utilizando maiores quantidades de camadas de células do cumulus, necessitando de novos estudos para reavaliar a técnica.

Referências

BARUSELLI, PIETRO SAMPAIO; GIMENES, LINDSAY UNNO; SALES, JOSÉ NÉLIO DE SOUSA. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, abr/jun. 2007.

BERGFELT, D. R.; BROGLIATTI, G. M.; ADAMS, G. P. Gamete recovery and follicular transfer (GRAFT) using transvaginal ultrasonography in cattle. **Theriogenology**. 1998.

HOELKER, M.; KASSENS, A.; SALILEW-WONDIM, D.; SIEME, H.; WRENZYCKI C.; TESFAVE D., NEUHOFF, C.; SCHELLANDER, K.; HELD-HOELKER, E. Birth of healthy calves after intra-follicular transfer (IFOT) of slaughterhouse derived immature bovine oocytes. **Theriogenology**, 49. doi:10.1016/j.theriogenology. 2017.

SPRICIGO, JOSÉ FELIPE WARMLING; DODE, MARGOT ALVES NUNES. **Transferência Intrafolicular de Ovócitos Imaturos (TIFOI): uma Alternativa para Produção de Embriões Bovinos**. 353. ed. Brasília: [s. n.], 2016.

SPRICIGO, J. F. W.; SENA NETTO, S. B.; MUTERLLE, C. V.; CAIXETA, F. M. C.; RODRIGUES, S. A. D.; PIVATO, I.; DODE, M. A. N. Intra-follicular immature oocyte transfer (IFIOT) derived embryos result in pregnancies in cattle. **Animal Reproduction**, v.13, n.3, p.471, 2016.

VIANA, JOÃO HENRIQUE MOREIRA. Estatísticas da produção e transferência de embriões no período pré-pandemia: Qual o real tamanho do mercado brasileiro?. **O Embrião**, [S. l.], p. 1-40, 1 set. 2021.

VIEIRA, ADRIANA FILÓ DE ALMEIDA. **TRANSFERÊNCIA INTRAFOLICULAR DE OÓCITOS IMATUROS (TIFOI) E A TAXA DE RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA EM VACAS ZEBUÍNAS**. 2022. Dissertação (Magister Scientiae) - Universidade Federal de Viçosa, [S. l.], 2022.

Agradecimentos

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

À Universidade Federal do Espírito Santo, por permitir a realização do estudo.
À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES).
À Ourofino Saúde Animal pelo fornecimento de insumos e hormônios utilizados no decorrer do desenvolvimento da pesquisa.