

PRIMEIRA AVALIAÇÃO DA OBTENÇÃO E QUALIDADE DE OÓCITOS POST MORTEM DE LHAMAS PELO AZUL CRESIL BRILHANTE

*(First recovery and quality assessment of post mortem oocytes
from llamas by brilliant cresyl blue)*

Leda Maria Costa PEREIRA^{1*}; Francisco Douglas Lima ANASTASIO²; Yvyna Byanca Simões de LIMA²; Germano Gonçalves TEIXEIRA¹; Evelyn de Castro PINHEIRO¹; Dárcio Ítalo Alves TEIXEIRA¹; Paulo Ricardo de Oliveira BERSANO²

¹Laboratório de Diagnóstico por Imagem aplicado à Reprodução, Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-Ceará. CEP: 60.740-000; ²Laboratório de Patologia e Medicina Veterinária Legal (UECE). *E-mail: leda.pereira@uece.br

ABSTRACT

This study aimed to demonstrate the applicability of the ovarian slicing technique in the recovery of *post mortem* oocytes in a llama (*Lama glama*) victim of acute bronchopneumonia and the effectiveness of the brilliant cresyl blue (ACB) technique to select quality oocytes for a subsequent *in vitro* culture. The ovary-salpinge-hysterectomy (OSH) was performed 12 hours after the animal's death. The ovaries were transported refrigerated immediately to the laboratory in Leibovitz medium (L-15). The oocytes were identified, quantified under a stereomicroscopic and classified according to two methods: conventional morphological classification and ACB assay. 26 oocytes classified by conventional morphology were obtained: 10 oocytes grade 1, 12 oocytes grade 2 and 4 oocytes grade 3. The use of the ACB dye demonstrated that 88% of the evaluated oocytes maintained their quality and were competent for the conservation of genetic or future material application in reproductive biotechnologies in this species. Further studies are suggested aiming to use selected oocytes with ACB to enhance the success of *in vitro* culture in this species.

Keywords: Camelids, oocyte, brilliant cresyl blue, reproductive biotechniques.

INTRODUÇÃO

Camelídeos sul-americanos como a lhama (*Lama glama*) e alpaca (*Lama pacos*) vêm sendo criados em cativeiro e utilizados para exposição em zoológicos e parques, para reprodução e comercialização de animais, além da produção de lã e transporte de cargas, características estas ainda pouco exploradas no país. As biotécnicas de reprodução assistida tais como a inseminação artificial (IA), a maturação *in vitro* de gametas (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV), têm como objetivo a maximização do desempenho reprodutivo das espécies animais. Em lhamas, devido ao longo período de gestação (335-360 dias) com apenas um nascimento por ano, torna-se de suma importância o desenvolvimento de técnicas reprodutivas visando otimizar a reprodução de fêmeas geneticamente superiores para intensificar o progresso genético nesta espécie. Entretanto, a tecnologia de transferência de embriões e os protocolos de superestimulação têm sido aplicados em camelídeos com sucesso limitado. Dentre os entraves identificados, pode-se citar os problemas relacionados à estimulação ovariana, a qualidade dos oócitos obtidos e as condições de cultivo (CORREA *et al.*, 1997).

Além disso, o número de oócitos obtidos por meio da aspiração folicular nestes animais é relativamente baixo. Estudo realizado por Ratto *et al.* (2005), utilizando protocolo de superovulação, obteve apenas 11 oócitos com a utilização desta técnica. Complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) aspirados de folículos de 1-12mm de lhamas não estimuladas proporcionaram

uma média de 6 oócitos/animal com 62% atingindo o estágio de metáfase II após 36h de cultivo *in vitro* (DEL CAMPO *et al.*, 1994).

Devido à baixa obtenção quantitativa e qualitativa de oócitos, o corante Azul Cresil Brillante (ACB) pode ser empregado como ferramenta para a seleção de oócitos competentes que serão utilizados na maturação *in vitro* (MIV). O corante ACB possibilita a identificação da fase de desenvolvimento oocitário, por meio da metabolização dessa substância pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Conforme a competência oocitária vai progredindo, ocorrem alterações metabólicas na atividade de determinadas enzimas, como a G6PDH. Os oócitos provenientes de folículos no final do desenvolvimento apresentam menor atividade da enzima G6PDH quando comparados aos gametas femininos no início de seu desenvolvimento, sendo possível identificar a fase em que o oócito se encontra, uma vez que o corante ACB é metabolizado e reduzido a um composto de coloração menos intensa pela enzima G6PDH (MANGIA e EPSTEIN, 1975). Devido à sua importância e o escasso conhecimento sobre a biologia reprodutiva e o sucesso limitado na aplicação de biotécnicas reprodutivas em lhamas, este trabalho teve o objetivo de avaliar a técnica de fatiamento ovarino (*slicing*) para a obtenção de oócitos e avaliar a competência dos mesmos por meio do azul cresil brilhante visando o uso futuro no cultivo *in vitro* e o incremento das taxas de metáfase nesta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem do material em estudo e processamento dos ovários

Utilizou-se uma fêmea de Lhama (*lama glama*), a qual foi encaminhada da Fazenda de Experimentação Agropecuária Dr. Esaú Accioly Vasconcelos, Guaiúba, Ceará, para a sala de Necropsia do Hospital Veterinário Prof. Sylvio Barbosa Cardoso (UECE), vítima de broncopneumonia aguda. A necropsia foi realizada cerca em média 12h após a sua morte.

Após a OSH, o útero e os ovários foram mensurados. Os ovários foram isolados assepticamente, lavados em meio MEM/HEPES, colocados em tubo Falcon contendo meio Leibovitz (L-15) e transportados imediatamente para o laboratório. Feito isto, foram transferidos para placa de Petri contendo PBS. Os ovários foram seccionados em fatias finas com lâminas de bisturi ao longo do seu comprimento e largura (*slicing*), para a liberação dos complexos *cumulus*-oócito (COCs). Os oócitos foram identificados, quantificados sob lupa estereomicroscópica (Leica[®] MZ 12,5) e classificados de acordo com dois métodos: classificação morfológica convencional e ensaio de azul cresil brilhante (ACB).

Na classificação morfológica convencional, os oócitos foram avaliados conforme a homogeneidade, coloração do citoplasma e número de camadas das células do *cumulus* segundo os critérios morfológicos adotados por De Loose *et al.* (1989) e divididos em três graus: grau 1 (G1): COCs com cinco camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo; grau 2 (G2): COCs com duas a quatro camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo; grau 3 (G3): COCs com uma camada de células do *cumulus* ou parcialmente desnudo e citoplasma vacuolizado e grau 4 (G4) oócitos desnudos e com citoplasma granular.

Ensaio com azul cresil brilhante para seleção dos oócitos competentes

O ensaio do ACB foi baseado no protocolo adotado por El Shourbagy *et al.* (2006). Imediatamente, após a seleção morfológica dos oócitos, os COCs foram incubados em gotas de

200µL de ACB diluído em PBS (26µM; B-5388; Sigma, St Louis, MO, USA) por um período de 60 minutos. Decorrido esse tempo, os COCs foram lavados em três gotas de 200µL de PBS e os oócitos foram classificados de acordo com a coloração, como ACB (+) (citoplasma azulado, sendo considerados competentes) e os oócitos e ACB (-) (citoplasma incolor, considerado menos competentes). A classificação dos oócitos foi realizada sob estereomicroscópio com magnitude de 50x.

Análise Estatística

Para análise estatística foi contabilizada a proporção (%) de oócitos ACB positivos (corados em azul pelo azul cresil brilhante) do total de oócitos avaliados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O útero e os ovários foram avaliados na busca de alterações patológicas e mensurados. As seguintes dimensões foram observadas: corno uterino com 7cm x 2cm; cérvix com 6cm x 4cm e os ovários com 1cm x 1,5cm. Foram obtidos 26 oócitos por meio da técnica do *slicing* classificados morfológicamente em: 10 oócitos grau 1, 12 oócitos grau 2 e 4 oócitos grau 3. Do total de oócitos avaliados, uma proporção de 88% oócitos (n=23) foram identificados como ACB positivos. Dois métodos de obtenção de oócitos são utilizados nos camelídeos sul-americanos: o *slicing* ou fatiamento ovarino e a aspiração de folículos utilizando uma agulha acoplada a uma seringa (CORREA *et al.*, 1997; RATTO *et al.*, 2005).

A técnica do *slicing* tem possibilitado a taxa mais alta de oócitos recuperados (27 por fêmea) entretanto tem-se observado uma população heterogênea de oócitos que contribuem para baixas taxas de maturação *in vitro* (DEL CAMPO *et al.*, 1994). Aspiração de folículos de 1 a 12mm resultaram numa média de 7 oócitos por fêmea e 2 a 3 oócitos após a aspiração de folículos de 3 a 6mm (RATTO *et al.*, 2005). Esse estudo foi eficaz na recuperação de oócitos *post mortem* do animal já que a quantidade obtida foi praticamente similar a mais alta já registrada. De forma similar, neste estudo uma população heterogênea de oócitos também foi observada.

Esse estudo representou a primeira avaliação utilizando o ACB para avaliar a qualidade de oócitos de lhama *post mortem* e foi obtida ótima taxa de sucesso. Estudos tem demonstrado que oócitos ACB+ apresentam maior diâmetro; maior volume; maior número de cópias de DNAm (DNA mitocondrial) que por sua vez, está associada com a competência oocitária, capacidade de fertilização e desenvolvimento embrionário; e maiores taxas de maturação nuclear *in vitro* quando comparado aos oócitos ACB (ALM *et al.*, 2005). O presente estudo além de proporcionar boa recuperação oocitária também demonstrou taxa eficaz de 88% de oócitos ACB+ mesmo a recuperação ocorrendo após 12h da morte do animal, demonstrando que o material genético de animais sejam estes domésticos, silvestres ou ameaçados de extinção podem ser conservados e aproveitados para biotecnologias reprodutivas.

Apesar do relativo sucesso em técnicas como superestimulação ovariana e transferência de embriões, técnicas como a inseminação artificial e fertilização *in vitro* ainda apresentam grandes entraves para seu desenvolvimento, devido às peculiaridades reprodutivas dessa espécie, como a ovulação induzida com meia-vida curta do corpo lúteo, o reconhecimento

materno da gestação curto, gestação só estabelecida no corno uterino esquerdo e machos com baixa concentração espermática. Assim, a possibilidade de selecionar oócitos de melhor competência para o desenvolvimento de biotécnicas favorece o progresso genético de espécies de alto valor zootécnico tornando possível a comercialização futura.

CONCLUSÕES

A lhama possui particularidades reprodutivas únicas que são responsáveis pelo sucesso limitado das técnicas reprodutivas. Dessa forma, a seleção de oócitos competentes anteriormente ao cultivo *in vitro* pode potencializar as taxas de M-II nesta espécie superando as limitações observadas na aplicação das biotécnicas reprodutivas nesta espécie.

REFERÊNCIAS

- CORREA, J.E.; RATTO, M.H.; GATICA, R. Superovulation in llamas (*Lama glama*) with pFSH and equine Chorionic Gonadotrophin used individually or in combination. *Animal Reproduction Science*, v.46, p.289–96, 1997.
- DE LOOSE F.; VAN VLIET, P.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, T.A.M. Morphology of immature oocytes. *Gamete Research*, v.24, n.2, p.197–204, 1989.
- DEL CAMPO, C.H.; DONOSO, M.X.; BERLAND, M. MAPLETOFT, R.J. *In vitro* fertilization and development of lhama (*lama glama*) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell. *Theriogenology*, v.41, n.6, p.1219-1229, 1994.
- EL SHOURBAGY, S.H.; SPIKINGS, E.C.; FREITAS, M.; ST JOHN, J.C. Mitochondria directly influence fertilization outcome in pig. *Reproduction*, v.131, n.2, p.233–45, 2006.
- LEON, J.B.; SMITH, B.B.; TIMM, K.I.; LECREN, G. Endocrine changes during pregnancy, parturition and the early post-partum period in the llama (*Lama glama*). *Journal of Reproduction and Fertility*, v.88, n.2, p.503–511, 1990.
- MANGIA, F.; EPSTEIN, C.J. Biochemical studies of growing mouse oocytes: Preparation of oocytes and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. *Developmental Biology*, v.45, n.2, p.211-220, 1975.
- RATTOA, M.; BERLANDB, M.; HUANCAC, W.; SINGHA, J.; ADAMSA, G.P. *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenology*, v.63, n.9, p.2445-2457, 2005.