

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS EM CULTURA INDIVIDUAL E EM GRUPOS

Carlos Henrique de Oliveira Constant¹; Antônio Guilherme Roncada Pupulim¹; Bárbara Fachini Agostinho¹; Isabele Picada Emanuelli²; Luiz Paulo Rigolon²

RESUMO: As variações nos índices de produção *in vitro* (PIV) de embriões, devem-se aos diferentes protocolos e sistemas que são utilizados. O número de embriões por gota de meio de cultivo é uma das variáveis que pode afetar os processos da PIV, sendo o cultivo o mais afetado. O objetivo desse trabalho foi avaliar as taxas de desenvolvimento embrionário em embriões cultivados em diferentes sistemas de acordo com o número de zigotos por gota. Foi conduzido um experimento com sete grupos para avaliar a influência do número de embriões por gota, onde G1A foi cultivado em micropoços; G1B35 cultivado individualmente em gota de 35 µl, G1B70 cultivado individualmente, G5 com 5 embriões, G10 com 10 embriões, G15 com 15 embriões e G20 com 20 embriões, estes 6 últimos cultivados em gotas de 70µl. Não houve diferença entre as taxas de clivagem. O G10 foi o que obteve a maior taxa de blastocisto (42,5%). Em relação a eclosão observou-se que os grupos com menor densidade (G1A, 51,1%; G1B70, 60% e G1B35, 50%) e o grupo de maior densidade (G20, 58,8%) apresentaram as menores taxas. Concluímos que o sistema de cultivo embrionário é mais eficiente se realizado em grupos e o volume ideal para o desenvolvimento é de 7µl/ embrião. No entanto, se houver a necessidade de cultivo individual, o sistema de micropoços foi o que permitiu melhores taxas de desenvolvimento embrionário em comparação aos outros grupos de cultivo individuais.

PALAVRAS-CHAVE: Bovino, Desenvolvimento embrionário, Sistema cultivo *in vitro*.

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões envolve as etapas de coleta de oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), bem como o cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias. É uma biotécnica utilizada, alternativamente para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir, pela aspiração *in vivo* de folículos guiada por ultra-sonografia, especialmente em bovinos, o descarte precoce em fêmeas geneticamente privilegiadas, portadoras de alterações adquiridas que impedem que a reprodução ocorra de forma natural ou até mesmo pela transferência de embriões. Ainda podemos apresentar a possibilidade de conservação e regeneração de recursos genéticos em vias de extinção.

Sabemos que existem alguns problemas associados com a PIV, sendo que boa parte desses problemas estão relacionadas com o cultivo *in vitro*, envolvendo a suplementação protéica do meio de cultivo, como a albumina sérica bovina (BSA) ou soro fetal bovino (SFB), que quando adicionado ao meio fluido sintético de oviduto (SOF) melhora significativamente o desenvolvimento de embriões bovinos (LONERGAN et al.,

¹ Discente do curso de Medicina Veterinária do Cesumar. Departamento de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do PROBIC. c.h.do@hotmail.com; agpupulim@gmail.com; babi_fachini@hotmail.com.

² Docentes do CESUMAR. Departamento de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, Maringá – PR. isabele@cesumar.br.

1999). No entanto, o soro pode levar a alterações químicas no meio, prejudicando o desenvolvimento dos embriões e introduzindo componentes tóxicos ou patogênicos no sistema de cultivo (BAVISTER, 1992). Além destes fatores o cultivo individual ou em grupo também influencia no desenvolvimento embrionário, pois sabemos que em grupos há uma maior produção de fatores de crescimento pelos embriões que proporcionam um maior desenvolvimento dos mesmos, porém há uma grande produção de substâncias embriotóxicas, como íons de amônia, metabólitos embrionários e radicais livres. Sob essas condições, formam-se as espécies reativas de oxigênio (ROS) que em bovinos promovem lesões no DNA (TAKAHASHI et al., 2000). As ROS podem aumentar a demanda de enzimas antioxidantes para manter o controle homeostático e comprometer o potencial de desenvolvimento subsequente. Isto pode ser explicado pelo fato de que a concentração de O₂ no oviduto (entre 5-8%) de fêmeas mamíferas é menor do que no ambiente comumente utilizado para o cultivo *in vitro* (20% de O₂; FISHER; BAVISTER, 1993).

Com base nessas evidências, o objetivo desse trabalho foi avaliar as taxas de desenvolvimento embrionário em embriões cultivados em diferentes sistemas de acordo com o número de zigotos por gota viabilizando o melhor sistema para cultivos comerciais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os oócitos utilizados para o experimento foram obtidos de ovários de vacas azebuadas provenientes de frigoríficos da região de Maringá e transportados em solução fisiológica de NaCl 0,9% a 36 °C. No laboratório os ovários foram lavados em álcool 70%, e em solução fisiológica. Permaneceram em banho-maria a 36 °C, em tempo não superior a 3 horas após abate.

Folículos entre 2 e 8 mm de diâmetro foram puncionados com auxílio de seringa (10 ml) e agulha 18G (40 x 12). Os COCs aspirados foram mantidos no próprio líquido folicular e colocados para decantar em tubos de fundo cônico de 45 ml (IngáMed) por 15 minutos. Após a decantação foram selecionados sob estereomicroscópio (NIKON) de acordo com o aspecto morfológico do COCs. Foram selecionados apenas os COCs de melhor qualidade, ou seja, qualidade I (apresentando *cumulus* compacto com mais de três camadas de células, ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e coloração marrom) e qualidade II (apresentando o *cumulus* compacto, parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares).

Os COCs selecionados foram lavados duas vezes em meio TCM 199 – Hepes, com antibiótico, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 22µg/ml de piruvato. Após a lavagem, os oócitos foram colocados para maturar nas gotas em placa de petri (35mm, CORN), cobertos com óleo mineral (SIGMA) e levados para a estufa (38 °C, a 5% de CO₂ em ar), durante 22 a 24 horas.

Posteriormente a maturação, os COCs passaram por uma lavagem em meio de fecundação Talp-FIV acrescido de 0,003g de BSA (SIGMA), 50µg/mL de gentamicina (SIGMA), 220µl de PHE, 55µl de heparina e 22µg/mL de piruvato, e foram transferidos para o meio FIV em gotas de 70ul, cobertos com óleo mineral (SIGMA). Após esse procedimento a placa foi devolvida a estufa para dar início a preparação dos espermatozoides.

O sêmen congelado (previamente testado) de um touro da raça nelore, da mesma partida foi utilizado durante todo o experimento. A cada rotina de PIV o sêmen foi descongelado em banho-maria a 35 °C por 1 minuto. A recuperação espermática foi realizada através da passagem do sêmen pelo gradiente de Percoll 45% e 90%, cujo objetivo foi obter os espermatozóides viáveis após a remoção do diluidor e do plasma seminal. A dose inseminante foi de 2.10⁶ sptz/ml, permanecendo na estufa por 18 horas

sob as mesmas condições de maturação. Após a fecundação as células do *cumulus* dos possíveis zigotos foram retiradas parcialmente por pipetagem rápida e lavados três vezes em meio de cultivo embrionário SOF, suplementado com 10% de SFB, 25 µl de gentamicina e 22 µg/ml de piruvato.

Após a FIV os zigotos foram divididos aleatoriamente em sete grupos, sendo os grupos G1A, G1B35, G1B70 em cultivo individual de embriões, onde G1A foi desenvolvido em micropoços (*Well of the Well*), G1B35 em gota de 35µl (microlitros) e G1B70 em gota de 70µl. O restante dos zigotos foram divididos em: G5 com 5 embriões, G10 com 10 embriões, G15 com 15 embriões e G20 com 20 embriões, cultivados em gotas de 70µl contendo meio CIV e cultivados em uma atmosfera controlada a 5% de CO₂, 5% de O₂ balanceado em N₂ a 38,5 °C.

No terceiro dia de cultivo embrionário foi realizada a avaliação da clivagem, no sétimo dia dos embriões que chegaram ao estágio de blastocisto e no décimo dia os blastocistos eclodidos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os grupos analisados (tabela 1) não houve diferença entre as taxas de clivagem. O G10 foi o que obteve a maior taxa de blastocisto (42,5%) dentre os grupos. Em relação a taxa de blastocisto eclodido, observa-se que os grupos com menor densidade (G1A, G1B70 e G1B35) e o grupo de maior densidade (G20) apresentaram as menores taxas. Portanto, para se obter uma maior eficiência no cultivo embrionário pode-se utilizar 5 a 10 zigotos por gota de 70µl de meio CIV, pois se baseando nos resultados obtidos pelo presente estudo, foi o sistema de cultivo que provavelmente melhor concentrou fatores embriotróficos que permitiram a progressão da cinética do desenvolvimento embrionário. São vários os fatores embriotróficos como o IGFI e II (fatores de crescimento semelhantes a insulina), TGFα e TGFβ (fatores de crescimento transformadores), interferon-t, EGF (fator de crescimento epidermal) entre outros (GOOVAERTS, et al., 2009).

Podemos sugerir que o número de embriões do G5 e G10 pudesse uma dispersão adequada dos componentes tóxicos ou patogênicos no sistema de cultivo, dados estes verificados nas taxas de clivagem, blastocisto e blastocisto eclodidos.

Tabela 1. Comparação das taxas de clivagem, blastocisto e blastocisto eclodido entre os grupos, em que G1A (WOW); G1B70 (1 zigoto/gota de 70ul); G1B35 (1 zigoto/gota de 35ul); G5 (5 zigotos); G10 (10 zigotos); G15 (15 zigotos); G20 (20 zigotos) em gotas de 70ul

Tratamento	Oócitos	Cliv	Cliv %	BL	% BL	Be	Be %
G1A	20	16	80,0	7	35,0	4	57,1
G1B70	20	17	85,0	5	25,0	3	60,0
G1B35	20	15	75,0	4	20,0	2	50,0
G5	40	36	90,0	12	30,0	10	83,3
G10	80	74	92,5	34	42,5	28	82,4
G15	90	79	87,8	25	27,8	18	72,0
G20	80	62	77,5	17	21,3	10	58,8

A principal importância do cultivo individual de embriões se dá pelo fato de simplificar os procedimentos de ovum-pick-up (OPU), pois, a baixa recuperação de oócitos pode necessitar de um cultivo individual ou de pequenos grupos, tanto para maturação, fertilização como para cultura embrionária (O'DOHERTY, et al., 1997; FUJITA, et al., 2006). O G1A foi o que obteve melhores taxas de blastocistos dentre os grupos de

cultivo individual, ou seja, foi melhor que o G1B70 e G1B35, fato que pode ser explicado pelas características físicas dos micropoços WOW que permitem uma maior diluição dos fatores tóxicos e um maior acúmulo dos fatores autócrinos, sendo considerado uma opção viável para o cultivo de embriões individualmente. Em um estudo que cultivou embriões FIV nos micropoços WOW obteve-se 61% de blastocistos resultados superiores aos 35% obtidos no presente estudo (VAJTA, et al., 2000). Em relação as taxas de clivagem, blastocisto e eclosão dos G1B70 e G1B35 (tabela 1) não houve diferença, portanto, em cultivos individuais o volume das gotas não interferem no desenvolvimento embrionário. Porém, a produção *in vitro* em grupos maiores, reduz custos, requer uma menor quantidade de meio e o tempo dispendido na manipulação dos oócitos e embriões é menor (GOOVAERTS, et al., 2009).

Em um estudo que comparou a cultura de diferentes números de oócitos no desenvolvimento embrionário, obteve as maiores taxas de clivagem e blastocistos no cultivo com 20 a 40 oócitos, sendo a diluição das gotas de 10 µl e 5 µl/embrião respectivamente, resultados que corroboram com o presente estudo cuja as melhores taxas foram do grupo G10 cuja a diluição foi de 7 µl/ embrião. Portanto, os resultados deste experimento indicaram que existem benefícios na cultura de oócitos e embriões em grupos, podendo ser explicado pelo fato de haver a secreção de fatores de crescimento pelos embriões que beneficiam uns aos outros no grupo (O'DOHERTY, et al., 1997).

Em um estudo que avaliou o efeito do volume das gotas no cultivo individual e em grupo de embriões obteve-se taxas de clivagem e de blastocistos (respectivamente) nos grupos individuais em gotas de 20 µl de 54,5% e 2,2% e nas de 500 µl de 63,5% e 1,2%. Já nas culturas em grupos, obteve-se nas gotas de 50 µl 69,8% de clivagem e 24,6% de blastocisto e na de 500 µl, 62,2% e 16,1% respectivamente. Portanto, independente do volume das gotas as taxas de blastocistos foram bem maiores nos embriões cultivados em grupos (GOOVAERTS, et al., 2009).

Fujita, et al (2006) observou que não houve diferença nas taxas de clivagem entre o número de embriões nas gotas de cultivo (de 1 a 5 embriões/gota de 5µl), porém houve aumento nas taxas de blastocistos em gotas com 5 embriões (31,7%) comparado a gota com 1 embrião (13,3%), resultados que corroboram com o presente estudo. Estes resultados sugerem que o número de embriões cultivados por gota são importantes para dar suporte ao desenvolvimento embrionário.

Desta forma, os resultados do presente estudo sugerem que os cultivos individuais ou com poucos zigotos por gota reduzam a taxa de produção de blastocistos devido a possível redução da concentração de fatores de crescimento em suas gotas de cultivo, e que embriões cultivados em grande número por gota, retardem a cinética do desenvolvimento embrionário ou até mesmo reduza a produção dos mesmos.

4 CONCLUSÃO

No presente estudo concluímos que o sistema de cultivo embrionário é mais eficiente se realizado em grupos do que individualmente e o volume ideal para o desenvolvimento embrionário é de 7µl/ embrião. Em adição pode-se concluir que em cultivos embrionários individuais o volume das gotas não interferem no desenvolvimento, no entanto o sistema WOW foi o que permitiu melhores taxas de desenvolvimento embrionário em comparação aos outros grupos de cultivo individuais.

REFERÊNCIAS

BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryo: facts and artifact. **Hum. Reprod. Update**, v.1, p.91-148, 1995.

CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; VAN LANGENDONCKT, A.; MERMILLOD, P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, New York, v. 43, n. 6, p. 1115-1128, 1995.

FISHER, B. BAVISTER, B.D oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **J Reprod. Fétil**, Cambridge v. 99, p. 673-679, 1993.

FUJITA, T., et al. Effect of group and embryo-culture conditioned medium on development of bovine embryos. **Journal of reproduction and development**, Kuju, v.52, p.137-142, 2006.

GONÇALVES, Paulo Bayard Dias; FIGUEIREDO, José Ricardo; FREITAS, Vicente José de FIGUEIREDO. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 1.ed. São Paulo: Varela, 2002.

GOOVAERTS, I.G.F., et al. Effect of cumulus cell coculture and oxygen tension on the in vitro developmental competence of bovine zygotes cultured singly. **Theriogenology**, Gebouw, v. 71, p. 729-738, 2009.

O'DOHERTY, E.M., et al. Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocysts. **Theriogenology**, Dublin, v. 48, p.161-169, 1997.

TAKAHASHI, H., et al. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in vitro culture bovine embryos by COMET assay. **Theriogenology**, New York v.53, n.3, p. 365, 2000.

VAJTA, G., et al. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. **Molecular Reproduction and Development**, Tjele, v.55, p. 256- 264, 2000

VAN SOOM, A.; YUAN, Y.Q; PEELMAN,L.J; MATOS, D.G. et al. Prevalence os apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultures under different oxygen tensions with or without cysteina addition. **Theriogenology**, New York, v.57, p. 1453-1465, 2002.