

Meios de cultivo para produção de embriões *in vitro* de ovinos

Jaquelyne Negri¹; Carla Bompiani d'Ancora Dias²; Luiz Paulo Rigolon³; Fabio Luiz Bim Cavaleiri³; Isabele Picada Emanuelle³; Fábio José Lourenço³; Milena Brandão Seko⁴.

RESUMO: O experimento foi desenvolvido no Centro de Biotecnologia da Reprodução (BIOTEC), localizado no município de Maringá. O devido experimento teve como objetivo a produção de embriões *in vitro* de ovinos usando meio de transporte, maturação, capacitação, fertilização e cultivo utilizados para bovinos. Para isto, foram realizadas aspirações foliculares em dez ovelhas de raça SRD de 2 a 3 anos escolhidas aleatoriamente com peso aproximado de 40 kg cada animal e com OPG dentro da normalidade. Após a seleção das ovelhas foi colocado um implante de Progesterona (CIDR) no dia que denominamos (D0), oito dias após (D8) foi aplicado 200 UI de Pluset, 250 UI de eCG mais 0,5 ml de PGF2alfa e 10 dias após o implante, os animais ficaram em jejum alimentar e hídrico por 24 e 12 horas respectivamente e no dia seguinte (D10) por meio cirúrgico, foram aspirados os dois ovários com bomba de vácuo WTA com pressão de 600 mm de mercúrio, sendo recuperado um número de 79 oócitos, numa média de 7,9 oócitos por ovelha, em seguida foram colocados em meio MIV-T a 38,5°C e depois maturados. Após 22-24 horas foram fecundados, sendo obtido somente um embrião de 4 células. A PIV de embriões ovinos possui um grande potencial para ser desenvolvida em direção à produção em larga escala. No entanto, as etapas da produção de embriões *in vitro* quando usados meios destinados a produção de embriões *in vitro* para bovinos, ainda mostra-se como o principal entrave, necessitando de maiores estudos.

PALAVRAS-CHAVE: Aspiração folicular; embriões, oócitos, ovinos.

INTRODUÇÃO

Atualmente, uma das ferramentas indispensáveis para a produção animal é a produção de embriões *in vitro*. O desenvolvimento dessa técnica deve-se aos avanços da biotecnologia, o qual engloba demais métodos tais como inseminação artificial e clonagem, ambas aprimorando a eficiência reprodutiva dos animais.

Um dos principais problemas encontrado na aplicação da produção de embriões *in vitro* a campo é a alta variação dos resultados obtidos (SCHWARTZ et al., 1998), isto se deve em parte, as condições de transporte dos oócitos das fazendas para o laboratório, que as vezes são realizadas de maneira inadequada. Vários fatores podem afetar as condições de maturação dos complexos cumulus oophorus durante o transporte, entre eles, o tipo de tampão utilizado (TESSMANN et al., (2004), a temperatura (SCHWARTZ et al., 1998), e o tempo de transporte. LEIVAS et al., (2004)

¹ Discente do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá (CESUMAR); Bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq). E-mail: jaquelyne_negri@hotmail.com

² Discente do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá (CESUMAR).

³ Docentes do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá (CESUMAR).

⁴ Bióloga do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Centro Universitário de Maringá – BIOTEC-CESUMAR

avaliaram a produção de embriões e a sua viabilidade após o transporte simulado de oócitos bovinos por períodos de 6, 12 e 18 horas em meio de manutenção TCM + HEPES a 39°C, sem controle de atmosfera gasosa. Os autores observaram que não houve redução na taxa de produção de embriões quando os oócitos foram transportados por 6 ou 12 horas em meio de manutenção, no entanto, o transporte dos oócitos por um período de 18 horas diminuiu a produção de embriões.

TESSMANN et al., (2004) também não encontraram diferença na produção de embriões quando os oócitos foram transportados em TCM-HEPES e em garrafa térmica a 38,5°C por 6 horas e também não observaram efeito da queda de temperatura de 38,5°C para 36,2°C durante as seis horas de transporte. TWAGIRAMUNGU et al. (1997) observaram que a produção de embriões foi menor quando os oócitos foram transportados por um período de 24 horas em meio TCM-HEPES e HAN F-10 + HEPES comparado ao TCM-199, não existindo diferença no transporte por 6 horas.

Quanto ao fator temperatura SCHWARTZ et al., (1998) não observaram diferença na produção de embriões quando os oócitos foram transportados a 20 °C por 10 horas em TCM-HEPES. Desta forma no transporte de oócitos para a produção *in vitro* de embriões se torna necessário determinar qual o meio ideal, tempo máximo de transporte e a temperatura de acondicionamento dos oócitos.

O objetivo do projeto é determinar o melhor meio de transporte, maturação, capacitação, fertilização para oócitos ovinos utilizando meios de produção de embriões *in vitro* de bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na fazenda experimental do Cesumar (BIOTEC), no período de agosto de 2008 a julho de 2009. Foram utilizadas 10 ovelhas (SRD) com peso de 40 kg, mantidas a pasto. As mesmas foram submetidas ao processo de aspiração folicular utilizando-se uma técnica cirúrgica. Os oócitos foram aspirados com uma solução contendo 2,0 % de soro fetal bovino (Nutricell), 25 UI/ ml de heparina sódica (Liquemine) e 98,0 % de PBS (Nutricell), evitando a coagulação sanguínea no interior do sistema de aspiração.

O material aspirado foi transferido para o filtro de colheita de embriões e lavado com a mesma solução utilizada durante a aspiração. O sedimento restante no filtro foi observado em placas de Petri e efetuada a busca e contagem dos oócitos com posterior classificação da qualidade. Os oócitos foram classificados de acordo com sua morfologia (número de camadas de células do *cumulus* e aspecto do citoplasma) em graus I, II e III (GI, GII e GIII), oócitos sem *cumulus* (s/c), expandidos (exp), degenerados (deg) e atrésicos (atr), segundo Lonergan, (1992), sendo que após a classificação, os mesmos foram acondicionados em tubos Corning de 2,0 ml com um meio (MIV-T) de transporte composto de TCM199 (Sais Hanks).

Logo após os oócitos foram maturados em TCM199 com sais de Earles, glutamina e NaHCO₃, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 22 µg/ml piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, 0,5 µg de FSH/ml, 50 µg de LH/ml e 1 µg de estradiol/ml, mantidos em estufa, a 38,5°C, 5% de CO₂ em ar com máxima umidade durante 22-24 horas. Durante esse período os CCOs permaneceram em microgotas de 100µl de meio de maturação coberta por óleo mineral.

A fecundação foi realizada em 100 µl de meio TALP suplementado com 10 µg/ml de heparina, 22 µl/ml de piruvato, 50 µg/ml de gentamicina, albumina sérica bovina-BSA (sem ácidos graxos), solução de PHE (2 µM de penicilina, 1 µM de hipotaurina e 0,25 µM de epinefrina). O sêmen utilizado foi de ovino da raça Texel, descongelado em banho-maria a 35°C. Para seleção dos espermatozóides móveis e remoção de diluidores e plasma seminal, foi realizada centrifugação em gradiente percoll (45 e 90), durante 30

segundos. Foram utilizados 2×10^6 espermatozoides/ml e após 30 minutos de incubação dos espermatozoides, os CCOs foram transferidos para as microgotas (20 oócitos/gota), onde permaneceram por 10 a 18 horas, a $38,5^\circ\text{C}$, em atmosfera com 5% de CO_2 em ar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de oócitos aspirados de ovelhas estimuladas com hormônio pelo método cirúrgico foi de 79 oócitos, (7,9 oócitos por ovelha). Este resultado é próximo do que foi encontrado por BALDASSARE et al., (1996). Após a maturação, os oócitos foram fecundados obtendo como resultado somente um embrião de 4 células. Segundo LIMA VERDE et. al., (2003) a etapa de MIV ainda mostra-se como o principal entrave, necessitando de maiores estudos.

CONCLUSÃO

Um maior emprego da produção de embriões *in vitro*, utilizado para o melhoramento genético de rebanhos ovinos, depende de alguns avanços a serem efetuados em etapas da produção.

Devem-se desenvolver meios próprios para produção *in vitro* de embriões ovinos, já que não é possível produzir embriões comercialmente com meios utilizados para produção *in vitro* de embriões bovinos.

REFERÊNCIAS

BALDASSARE, H. FURNUS, C.C., DE MATOS, D.G, PESSI, H. *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis. **Theriogenology**, 53:649-658.1996.

LEIVAS, F.G.; BRUM, D.S.; MEZZALIRA, A.; PILLA, L.F.C.; BERNARDI, M.L.; RUBIN, M.I.B. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa. **Ciência rural**, v.34, n.1, p.219-224, 2004.

LIMA VERDE, J.B., RONDINA, D., FREITAS, V.J.F. **Produção *in vitro* de embriões ovinos**. *Ciência Animal*, 13(2):79-87, 2003.

SCHWARTZ, J.; SCHNEIDER, M.R.; RODRIGUES, J.L.; REICHENBACH, H.D. Effect of short-term storage of bovine oocytes in different media and temperature on the subsequent *in vitro* embryo development. **Theriogenology**, v.50, p.217, 1998.

TESSMANN, J.V.; MOZZAQUATRO, F.D.; RAUBER, L.P.; SANTOS, M.V.; CHEQUIM, R.M. et al. Transporte-maturação de oócitos bovinos em palhetas. **Acta Scientiarum Veterinariae**, v. 32, n.3, p.177-184, 2004.

TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; GUIBAULT, L.A.; SIRARD, M.A.; BOUSQUET, D. Media e time o oocytes transport influence their development competence for *in vitro* production of bovine embryos. **Theriogenology**, v.49, p.299, 1997.