



EFEITO DO TRANSPORTE DE EMBRIÕES BOVINOS A LONGAS DISTÂNCIAS CULTIVADOS *IN VITRO* A FRESCO

Wilian Mortene da Silva¹; Amanda Thaine Stivam Martins²; Antonio Hugo Bezerra Colombo³; Fabio Luiz Bim Cavaleiri³; Danieli Aparecida Bóbbio Moreski⁴; Milena Brandão Seko⁴

RESUMO: No presente trabalho objetivou-se avaliar viabilidade de embriões cultivados *in vitro* a fresco, depois de simulado transporte por 24 e 48 horas. Foram coletados ovários de vacas mestiças em abatedouro, aspirados e submetidos à fertilização *in vitro* com sêmen convencional. Depois de aspirados os complexos *cumulus* oócitos foram selecionados com no mínimo, três camadas de células do *cumulus* compactas e o citoplasma homogêneo, maturados, fecundados e cultivados *in vitro*. As estruturas foram separados aleatoriamente e divididos em três grupos distintos, sendo Tratamento controle, Tratamento 2 e Tratamento 3. O grupo T2 foi retirado no 5º dia de cultivo e simulado transporte por 48 horas no transportador WTA (Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda, Cravinhos, SP, Brasil). No D7 foi avaliada a taxa de blastocisto e devolvidos na incubadora, no D9 avaliado taxa de eclosão. No grupo T3 os embriões foram retirados da estufa 6º dia de cultivo, simulado transporte por 24 horas em transportador WTA. No D7 foi avaliada a taxa de blastocisto e devolvidos na estufa onde permaneceram até D9 e avaliada a taxa de eclosão. Comparados, cada um ao Tratamento controle, embriões que permaneceram na estufa até D7. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos e cinco repetições cada. As características estudadas foram: número de oócitos viáveis, taxa de blastocisto e taxa de eclosão. O estudo demonstra grande importância devido o tempo gasto nestes transportes interferir na viabilidade dos embriões e nas taxas de prenhes.

PALAVRAS-CHAVE: Aspiração; Embriões; Fertilização.

1 INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira é de importância fundamental no desenvolvimento da economia do país. Suas atribuições vão desde o fornecimento de alimentos para a população, geração de emprego, renda e mercado consumidor para bens industrializados (BRASIL 2014). O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, é um dos maiores produtores e o primeiro exportador no ranking mundial de carne bovina (USDA, 2014).

No 2º trimestre de 2013, o país atingiu novo recorde histórico, com cerca de 8,557 milhões de cabeças abatidas (IBGE, 2013). A posição de destaque alcançada na bovinocultura é auxiliada pela utilização e aperfeiçoamento de biotecnologias da reprodução e alta produção de embriões bovinos, que foi de 57.368 *in vivo* e 212.441 *in vitro* no ano de 2007, respondendo por quase um terço da produção mundial (SBTE 2009).

A produção *in vitro* de embriões associada à coleta de oócitos a partir da aspiração folicular guiada por ultra-som (ovum pick up - OPU) em bovinos é uma das principais

¹ Acadêmico do Curso Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR, Maringá – PR. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica da UniCesumar (PROBIC). wilianmortene@hotmail.com;

² Médica Veterinária Residente do Centro Universitário de Maringá - UNICESUMAR. amandatsmartins@gmail.com;

³ Orientadores, Docentes do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Maringá - UNICESUMAR. fabio.cavaleiri@unicesumar.edu.br

⁴ Biólogas, funcionárias do laboratório de Biotecnologia (BIOTEC) do Centro Universitário de Maringá - UNICESUMAR. milena.seko@unicesumar.edu.br



biotecnologias para o aumento das taxas reprodutivas do rebanho, certamente pelo predomínio da raça Nelore no país. Sendo a técnica que vem mostrando melhores índices, obteve avanços consideráveis nos últimos anos e está sendo rapidamente incorporada a projetos de reprodução (ALVES et. al., 2003; PONTES et. al., 2011; VARAGO et. al., 2008).

Porém alguns fatores são limitantes na produção *in vitro* de embriões, como a distância, entre os principais laboratórios de produção *in vitro* que estão localizados nas regiões sul e sudeste e as grandes fazendas produtoras de gado localizadas em novas áreas de produção ao norte do Brasil. O tempo gasto nestes transportes pode interferir diretamente na viabilidade dos embriões e nas taxas de prenhes (MARINHO et. al., 2012; ALVES et. al., 2003).

Uma escolha para longas distâncias é o transporte de embriões no próprio meio de cultivo, com controle da atmosfera gasosa, em incubadora portátil. Os embriões são transportados em diferentes estádios de desenvolvimento de maneira que o fim do transporte coincida com o fim do cultivo. (PONTES et. al., 2010)

Neste sentido justifica-se avaliar viabilidade de embriões cultivados *in vitro* a fresco, simulado transporte a longas distâncias, num período de 24 e 48 horas. Pois nos dias atuais a fertilização *in vitro* é uma das principais biotecnologias para o aumento das taxas reprodutivas do rebanho. Tendo como uma das principais limitações à distância entre as propriedades rurais e os laboratórios de produção de embriões, pelas grandes extensões territoriais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ovários utilizados para experimento foram obtidos de vacas abatidas no frigorífico VPR Brasil, Estrada Vital Batista de Andrade, 421, no município de Colorado - PR – Brasil, no período de 07/05 a 09/07 de 2014. Sendo que os ovários foram transportados ao laboratório no Centro de Biotecnologia de Reprodução BIOTEC – UNICESUMAR (Centro Universitário de Maringá- PR), Estrada Morangueira- Lote 31/35 Fazenda UNICESUMAR- Maringá/PR, em garrafas térmicas contendo solução fisiológica (0,9% NaCl), a temperatura variando de 35 a 37°C.

No laboratório, os ovários foram lavados em álcool 70%, solução salina e mantidos em banho-maria a 37°C sendo realizada aspiração imediatamente. Todo o material aspirado foi transferido para tubos Falcon de 50 ml. O sedimento foi transferido para placas de petri de poliestireno de 60 mm de diâmetro e avaliado sob estereomicroscópio com aumento de 50x, para seleção e classificação dos oócitos. Como critérios de avaliação dos oócitos, foi considerada a presença, o número de camadas o grau de expansão das células do *cumulus* e o aspecto do citoplasma quanto à cor, homogeneidade e integridade. Foram selecionados número de complexos *cumulus* oócitos viáveis, com no mínimo, três camadas de células do *cumulus* compactas e o citoplasma homogêneo segundo Gonçalves et al. (2008). Após seleção, os complexos *cumulus* oócitos foram maturados *in vitro* em placas de maturação, foi realizada em meio 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 39°C, 5% de CO₂ em ar com máxima umidade durante 22-24 horas.

Os oócitos foram colocados uma placa contendo 21 microgotas de 75µL de meio de maturação, com 10 oócitos por microgota, cobertas por óleo mineral. A fecundação foi



realizada em gotas de 75 μl de meio TALP suplementado com 10 $\mu\text{g/ml}$ de heparina, 22 $\mu\text{l/ml}$ de piruvato, 50 $\mu\text{g/ml}$ 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 do touro Oceano da Boa Vista, raça Nelore. O sêmen foi descongelado em banho-maria a 35 °C por 30 segundos. Para seleção dos espermatozoides móveis e remoção de diluidores e plasma seminal, foi realizada centrifugação em gradiente percoll (90 e 45%), durante 9 minutos. Na fertilização utilizou-se 1×10^6 espermatozoides/mL, e após os oócitos foram transferidos para as microgotas (10 oócitos/gota), onde permaneceram por 24 horas, a 38,5°C, em atmosfera com 5% de CO₂ em ar.

Após a fertilização, os zigotos foram cultivados in vitro, no meio SOF (*Synthetic Oviduct Fluid*) suplementado com SFB (Soro Fetal Bovino), com monocamada de células da granulosa. O cultivo foi realizado por 24 horas pós-inseminação, em incubadora, com atmosfera gasosa controlada contendo 5% CO₂ 5% de O₂ e 90% de N₂. Realizou-se a renovação do meio de cultivo no D4. Foi utilizado um total n=338 embriões, divididos em cinco tratamentos: sendo T1 controle (n=70) oócitos, Tratamento T2 (n=70) oócitos: transporte de 48 horas e Tratamento T3 (n=70) oócitos. Os embriões de transporte foram retirados aleatoriamente da gota de meio cultivo na estufa e transferidos para tubo de 10 ml com meio de cultivo gaseificado no T2 simulado transporte por: 48 horas e T3: 24 horas. O grupo T1 foi mantido na estufa até 7º dia de cultivo onde foram avaliadas as características: taxa de blastocisto em D7. Em D9 avaliou-se a taxa eclosão. Todas as estruturas do T2 foram retiradas da incubadora e colocadas em um tubo de acrílico com meio CIV, sob- óleo mineral. Esse tubo foi gaseificado por 30 segundos, com mistura especial gasosa (5% de O₂, 5% CO₂, 90% de N₂), tampado com rolha de silicone e vedado com Parafilm[®], simulado transporte por 48 horas no transportador WTA a 37 °C. Ao término deste período as estruturas foram devolvidas na placa de CIV, onde anteriormente estavam sendo cultivadas na incubadora e foi avaliada a taxa de Blastocisto. No T3 Todas as estruturas foram retiradas da incubadora e colocadas em um tubo de acrílico com meio CIV, sob óleo mineral. Este tubo foi gaseificado por 30 segundos, com mistura especial gasosa (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂), tampado com rolha de silicone e vedado com Parafilm[®], simulado transporte por 24 horas no transportador WTA a 37 ° C.

Ao término do período CIV, as estruturas foram devolvidas na placa de CIV, onde anteriormente estavam sendo cultivadas na incubadora e foi avaliada a taxa de Blastocisto. No D9 avaliou-se a taxa de blastocistos eclodidos, tanto do grupo Tratamento Controle quanto T2 e T3. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 tratamentos e cinco repetições cada. As características estudadas foram: número de oócitos viáveis, taxa de blastocisto e taxa de blastocistos eclodidos.

O programa estatístico utilizado para a realização das análises foi o SAS (Statistical Analysis System) (2000), utilizando-se o procedimento "Proc Genmod" e distribuição binomial.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O transporte de embriões utilizado neste experimento foi eficiente mesmo quando comparado o T2, onde o transporte foi prolongado por 48 horas e obteve uma produção de 33% de embriões em D7 (tabela 1), demonstrando que o experimento apresentou-se de acordo com a média nacional de 35% de blastocisto no dia sete de cultivo (BRUM et. al.). O ambiente de transporte simulou as mesmas condições de atmosfera e de



temperatura do laboratório. Diante dos resultados obtidos, não foram significativas as diferentes variações de transporte do T2 e T3 quando comparadas ao Tratamento controle, justificados pela menor variação do pH do meio, devido controle da atmosfera gasosa com a gaseificação prévia dos tubos com (5% O₂, 5% CO₂, 90% de N₂) e controle eficiente da temperatura dos embriões de 37 ° C, utilizando transportador WTA.

Tabela 1: Número de oócitos, número de embriões, taxas de blastocisto em D7 e taxa de eclosão em D9 de embriões bovinos produzidos *in vitro* e transportados a fresco, por diferentes períodos de tempo, com controle de atmosfera gasosa.

VARIAVEIS	D5	D6	GRUPO CONTROLE
NÚMERO DE OÓCITOS	350	350	350
NÚMERO DE EMBRIÕES PRODUZIDOS	110	118	110
TAXA DE BLASTOCISTO %	33% ¹	35% ¹	31% ¹
TAXA DE ECLOSÃO %	78% ²	81% ²	82% ²

Valores seguidos do número ¹ na mesma coluna diferem entre si P= 0.4739

Valores seguidos do número ² na mesma coluna diferem entre si P= 0.5586

A taxa de embriões produzidos, a partir de oócitos obtidos de abatedouro com transporte em garrafa térmica por até 2 horas foi de 35 % em D6 (tabela 1). Este resultado corroboram aos encontrados por Alves et al. (2003) que foi de 33,6%. A quantidade de embriões produzidos, em alguns momentos, superou a quantidade esperada, dessa forma em determinadas situações ao longo do experimento parte dos embriões produzidos foram descartados.

4 CONCLUSÃO

O experimento demonstrou que as condições utilizadas no transporte foram eficientes e obtiveram resultados semelhantes a programas de PIVE realizados sem o transporte prévio de embriões, possibilitando o uso dessa biotecnologia comercialmente em larga escala por viabilizar o envio de embriões de propriedades distantes dos laboratórios de produção de embriões.

REFERÊNCIAS

ALVES, D. F. et al. Desenvolvimento embrionário in vitro de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. **Brazilian Journ Al Of Veterinary Research And Animal Science (2003): Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, Santa Maria - Rs, v. 40, n. 4, p.280-286, 06 maio 2003. Anual. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/11335/13103>>. Acesso em: 22 jul. 2014.', '186.215.125.66', 'Alves et al. (2003)', '(ALVES et al., 2003)', ', 11, ', '2014-07-22

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Ibge. **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária Setembro de 2013** Instituto. 2013. Adriana Helena Gama dos Santos. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201302_publ_completa.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2014.



BRASIL. Mapa. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica (Org.). **Plano mais pecuária**. Brasília: Biblioteca Nacional de Agricultura – Binagri, 2014. 32 slides, color, 20 x 28. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/Publicacao_v2.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2014.

BRUM, D.S.; LEIVAS, F.G.; BERNARDI, M.L.; RAUBER, L.P.; ALCEU M. ; A.; BRASS, K.E.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Cultivo individual de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v.39, n.2, p. 87-92, 2002. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/bjvras/v39n2/15806.pdf>>. Acesso em: 15 jul. 2014.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª. ed., Roca, São Paulo, 395 p., 2008

JORNAL O EMBRIÃO: Mudanças e tendências no mercado de embriões bovinos no Brasil. Jaboticabal: Sbte- Sociedade Brasileira de tecnologia de embriões, v. 42, ago. 2009. Mensal. Disponível em: <<http://issuu.com/sbte.org.br/docs/jornal-o-embriao-42#embed>>. Acesso em: 24 jul. 2104.', '189.86.90.18', 'Jornal O Embrião (2009)', '(JORNAL O EMBRIÃO, 2009)', ", 9, ", '2014-07-24

MARINHO, L. S. R.; UNTURA, R. M.; MOROTTI, F.; MOINO, L. L.; RIGO, A. G.; SANCHES, B. V.; PONTES, J. H. F.; SENEDA, M. M. Large-scale programs for recipients of *in vitro*-produced embryos. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 323-328, 2012.

PONTES, J.H.F. et al. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Teriogenology**, Mogi Mirim, v. 75, p.1640-1646, 31 dez. 2010. Anual. Disponível em: <<http://www.invitrobrasil.com.br/pdf/artigos-publicados/44-Ovum-pick-up-in-vitro-embryo-production.pdf>>. Acesso em: 24 jul. 2014.', '189.86.90.18', 'Pontes et al. (2010)', '(PONTES et al., 2010)', ", 11, ", '2014-07-24.

SAS INSTITUTE INC., **Statistical Analysis System**, Versão 8.0. Cary, NC: 2000. (Manual On-line).

UNITED STATES. CLAIRE M. United States Department Of Agriculture- Usda. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade: Major Traders and U.S. Trade of Beef, Pork, and Poultry**. 2014. Approved by the World Agricultural Outlook Board/USDA. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2014.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A.; Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 2, n. 32, p.100-109, 05 set. 2008. Mensal. Disponível em: <www.cbra.org.br>. Acesso em: 24 jul. 2014.', '189.86.90.18', 'Varago, Mendonça e Lagares (2008)', '(VARAGO; MENDONÇA; LAGARES, 2008)', ", 11, ", '2014-07-24.