

**MATURAÇÃO E FECUNDAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS EM TUBOS
PREVIAMENTE GASEIFICADOS E MANTIDOS EM BANHO-MARIA**
*(In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes in tubes previously gasified
kept in water bath)*

KURTZ FILHO, M.^{1,2}; SILVA, L.M.³; MOREIRA, B.³; BRUM, D.S.¹; LEIVAS, F.G.¹;
SILVA, C.A.M.⁴; RUBIN, M.I.B.⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFSM;

²Departamento de Morfologia, CCS, UFSM, Santa Maria, RS;

³Acadêmicos de Iniciação Científica, Embryolab;

⁴Embryolab.

RESUMO – A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos alcançada com vacas de matadouros ou de aspiração folicular *in vivo* (OPU) é uma prática cada vez mais difundida e a sua simplificação poderia baixar os custos de produção. O objetivo desta pesquisa foi comparar a produção *in vitro* de embriões em estufa com temperatura, umidade relativa e atmosfera controlada (controle), com tubos de poliestireno gaseificados e mantidos em banho-maria (tratamento). Oócitos obtidos de ovários de vacas abatidas foram maturados *in vitro* em TCM-199 modificado com 25mM de N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico (HEPES); 0,025mg/ml de piruvato de sódio, 0,01UI de rFSHh/ml, 0,5µg/ml de LHs e 10% de soro de vaca em estro. Na fecundação *in vitro* utilizou-se Talp-Fert com 0,06mg/ml de albumina sérica bovina, 0,022mg/ml de piruvato de sódio e 10µg/ml de heparina. O cultivo foi conduzido em placas de 4 poços em SOF com 5% de soro de vaca em estro, 20µl/ml de aminoácidos essenciais e 10µl/ml de aminoácidos não essenciais, sob óleo mineral, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, umidade saturada e 39°C, por 9 dias. Na maturação não houve diferença (P>0,05) entre o tratamento e o controle. Porém, a maturação e a fecundação ou somente a fecundação *in vitro* em tubos mantidos em banho-maria não demonstrou ser uma alternativa recomendada para a produção de embriões bovinos.

Palavras chave: embriões bovinos, tubos de poliestireno, banho-maria, PIV.

ABSTRACT – *In vitro* bovine embryo production either obtained from oocytes of slaughtered cows or *in vivo* follicular aspiration (OPU) is a well-known technique and its simplification might reduce the cost of embryo production. The aim of this study was to compare the cleavage rate and embryo development of the *in vitro* production of bovine embryos using standard culture system (temperature, gas phase and controlled humidity) *versus* gasified polystyrene tubes kept in water bath. Oocytes obtained from ovaries of slaughtered cows were *in vitro* matured in TCM-199 modified with 25 mM of N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES); containing 0.01UI rFSHh/ml and 0.5µg/ml LHs, 0.025mg/ml sodium pyruvate and 10% estrous cow serum. The *in vitro* fertilization was carried out in Talp-Fert containing 0.06mg/ml BSA, 0.022mg/ml sodium pyruvate and 10µg/ml heparin. The culture was performed in SOF medium with 20µl/ml essential aminoacids, 10µl/ml, non-essential aminoacids and 5% estrous cow serum, with oil overlay, in 4 well dishes and incubated with 5% CO₂, maximum humidity at 39°C, for 9 days. The results of this study showed no difference (P>0.05) between the treatment and control groups during the maturation process. However, the maturation and fertilization or only the fertilization in tubes do not represent a viable alternative for the *in vitro* production of bovine embryos.

Key words: bovine embryo, polystyrene tubes, water bath, PIV.

Introdução

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos deve ser vista como mais uma alternativa a ser introduzida nos programas de reprodução assistida, pois, além de sua relevância para estudos biotecnológicos possui fundamento comercial. Em bovinos, a PIV associada à transferência de embriões é uma valiosa ferramenta para difundir animais geneticamente superiores. As recentes pesquisas têm visado estabelecer um sistema de produção eficiente, que não envolva equipamentos sofisticados e com elevado custo como as estufas gaseificadas, consideradas um fator limitante.

Os oócitos bovinos podem ser obtidos de ovários de vacas abatidas em frigoríficos, fonte abundante de oócitos para pesquisa. Eventualmente também pode-se utilizar vacas de excelente desempenho e de alto valor comercial que, quando abatidas seriam aproveitadas. Adicionalmente, a coleta *in vivo* de oócitos de fêmeas bovinas adultas e pré-púberes de alto valor genético tem se tornado um procedimento freqüente (PIETERSE *et al.*, 1991; KRUIP *et al.*, 1994; SANTL *et al.*, 1998) através da aspiração transvaginal (OPU).

A PIV compreende três fases distintas: a maturação e a fecundação do oócito, e o cultivo dos zigotos em diferentes meios conforme a fase. O processo de produção é conduzido em estufas com atmosfera, temperatura e umidade controladas. Diversas tentativas têm sido feitas para diminuir custos e melhorar a eficiência dos sistemas de produção tais como: a subdivisão interna da estufa; uso de bolsas gaseificadas com CO₂, O₂ e N₂ em estufa ou submersas no banho-maria (WANG *et al.*, 1992; VAJTA *et al.*, 1997; PALMA *et al.*, 1997). Iniciar o processo de maturação e fecundação imediatamente após a aspiração folicular seria um instrumento de apoio valioso aos programas comerciais de produção *in vitro* em bovinos. Com este objetivo comparou-se o desenvolvimento de embriões bovinos maturados e/ou fecundados em tubos de poliestireno previamente gaseificados e mantidos em banho-maria, com o desenvolvimento de embriões produzidos pelo método convencional.

Material e Método

Os ovários bovinos obtidos de frigoríficos foram transportados a 30°C, em solução salina com 0,9% de NaCl acrescida de 100UI/ml de penicilina G-potássica¹ e mantidos em banho-maria a 30°C até a aspiração. Os folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm foram aspirados com auxílio de uma bomba de vácuo² e agulhas de 25 mm x 8 mm (21g)³ em um período não superior a quatro horas após a coleta. Após a sedimentação das células em líquido folicular, procedeu-se à identificação dos complexos *Cumulus* oócitos (CCO), sob estereomicroscópio⁴. Os CCO que apresentavam várias camadas de células do *cumulus oophorus*, compactas, claras e transparentes e o ooplasma, homogêneo, com qualidade 1 e 2, de acordo com De LOSS *et al.* (1989), foram selecionados e lavados em líquido folicular centrifugado e imediatamente após lavados em meio TCM-199⁵, modificado com 25mM de HEPES; 0,025mg/ml de piruvato de sódio e 10% de soro de vaca em estro (SVE)⁶ para serem distribuídos aleatoriamente nos diferentes

¹Sigma Chemical Company – P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, USA.

²Nevoni Equipamento Odonto-Médico Hospitalar Ltda – Rua Dom João V, 266/280 Lapa 05.075.060 São Paulo, SP, Brasil.

³Vacutainer, BECTON DICKINSON COMPANY, N I., USA.

⁴Carl Zeiss – 73446, Oberkochen, Alemanha.

⁵GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA.

⁶Embryolab - Coletado e processado pela equipe, UFSM, Santa Maria, RS.

⁷Nunc A/S – Kamstrupvej 90 – P.O. Box 280 DK-4000 Roskilde, Dinamarca.

⁸Serono Pharma S.p.^a - 70123, Bari, Itália.

⁹Lutogen - AUSA International Inc. 12872 HWY.155 Bldg.15, Tyler, TX., USA.

¹⁰W.C. HERAEUS GmbH. Postfach 1553 D-6450 Hanau 1, Alemanha.

¹¹Fisher Scientific Company - Pittsburgh, PA 15219m USA. Ref. 14-956-3C.

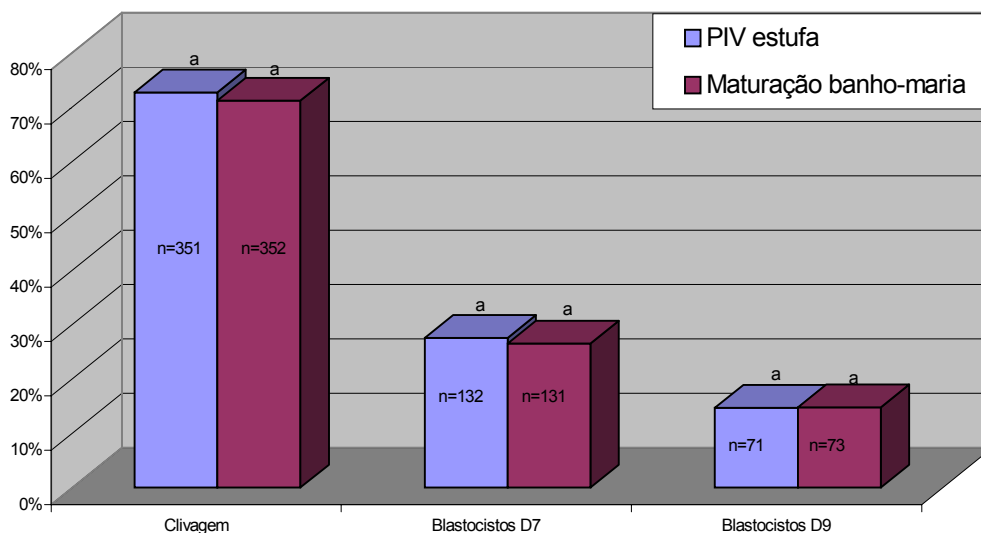
¹²Prüfgeräte-Werk Medingen GmbH-Lesskestrasse, 10 O-8210 Freital, Alemanha.

tratamentos. A metodologia de coleta dos ovários, procura e seleção dos óocitos, assim como os meios utilizados foram semelhantes nos três experimentos. Foram cultivados 3.471 CCO nos três experimentos. A avaliação da taxa de clivagem ao segundo (D2- clivagem), ao sétimo dia (D7- blastocistos iniciais, blastocistos e blastocistos expandidos) e ao nono dia (D9- blastocistos expandidos, blastocistos em eclosão e blastocistos eclodidos) de desenvolvimento embrionário foi realizada de acordo com ROBERTSON e NELSON (1999), considerando-se como dia zero (D0), o dia da fecundação.

Experimento 1: Os óocitos foram distribuídos em grupos de 20 a 40 e alocados em gotas de 400µL em placas

Nunc⁷ de 4 poços com o meio de maturação TCM-199 modificado com 0,025mg/ml de piruvato de sódio, 10% de SVE adicionando-se 0,01UI de rFSHh/ml⁸ e 0,5µg/ml de LHs⁹, constituindo o grupo controle cuja maturação foi conduzida em estufa¹⁰ a 39°C em atmosfera com 5% de CO₂ e umidade saturada. Este grupo controle foi comum aos três experimentos. Os óocitos maturados em banho-maria (grupo tratamento) foram equilibrados em tubos¹¹ em meio idêntico aos óocitos do grupo controle, porém com 25mM de HEPES, por 2 horas em estufa com 5% de CO₂ e umidade saturada, sendo então vedados com tampa de silicone, protegidos da radiação luminosa por papel alumínio, e colocados em banho-maria¹² a 39°C, onde permaneceram por 22 horas.

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DA CLIVAGEM, BLASTOCISTOS EM D7 E D9, DE ÓOCITOS BOVINOS MATURADOS EM TUBOS MANTIDOS EM BANHO-MARIA. 2002.



Após a maturação, os CCO foram transferidos para o meio Talp-Fert com 0,06mg/ml de albumina sérica bovina (BSA), 0,022mg/ml de piruvato de sódio e acrescido de 10µg/ml de heparina. Os espermatozoides foram selecionados pelo método de migração ascendente (*swim-up*) realizado em meio Talp-Sperm com 0,06mg/ml de BSA e 0,011mg/ml de piruvato de sódio. A dose inseminante foi de 1×10^6 espermatozoides/ml e os CCO foram incubados com os espermatozoides

em placas de 4 poços, durante 18 horas. Após este período os supostos zigotos foram submetidos à agitação mecânica por 90 segundos para a retirada das células do *Cumulus oophorus*, lavados e cultivados (grupo controle n=483; tratamento n=495) em SOF com 5% de SVE, 20µl/ml de aminoácidos essenciais e 10µl/ml de aminoácidos não essenciais, sob óleo mineral, em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, umidade saturada e 39°C, por 9 dias.

Experimento 2: Após a seleção, os CCO foram distribuídos aleatoriamente em placas (controle) e em tubos (tratamento) e maturados de forma semelhante ao experimento 1. Posteriormente, procedeu-se à fecundação que para o grupo controle ocorreu em placas, no meio de fecundação Talp-Fert, e em estufa. Os CCO do tratamento foram incubados com os espermatozoides em tubos, previamente equilibrados durante 2 horas e selados com tampa de silicone e mantidos em banho-maria. Este conjunto, envolto em papel alumínio foi colocado em banho-maria a 39°C, onde permaneceu por 18 horas. Após este período, os supostos zigotos do grupo controle (n=1.019) e do tratamento (n=999) foram submetidos à agitação mecânica por 90 segundos, e transferidos para placas com meio de cultivo SOF em procedimento idêntico ao do experimento 1, permanecendo em estufa.

Experimento 3: Após a maturação em estufa, a fecundação dos CCO do grupo tratamento foi realizada em tubos com o meio Talp-Fert previamente equilibrado em estufa por 2 horas e após selado com tampa de silicone. Este conjunto, envolto em papel alumínio foi mantido em banho-maria a 39°C, por 18 horas. Decorrido este período, os prováveis zigotos (controle, n=235; tratamento, n=240) foram submetidos à agitação mecânica por 90 segundos e posteriormente transferidos para placas Nunc de 4 poços com meio de cultivo SOF.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo efetuadas 10, 11 e 4 repetições, nos experimentos 1, 2 e 3, respectivamente. Para análise estatística utilizou-se o teste Qui-quadrado; para a comparação das frequências foi utilizado o nível de significância de 5% e nenhuma repetição foi desprezada.

Resultados e Discussão

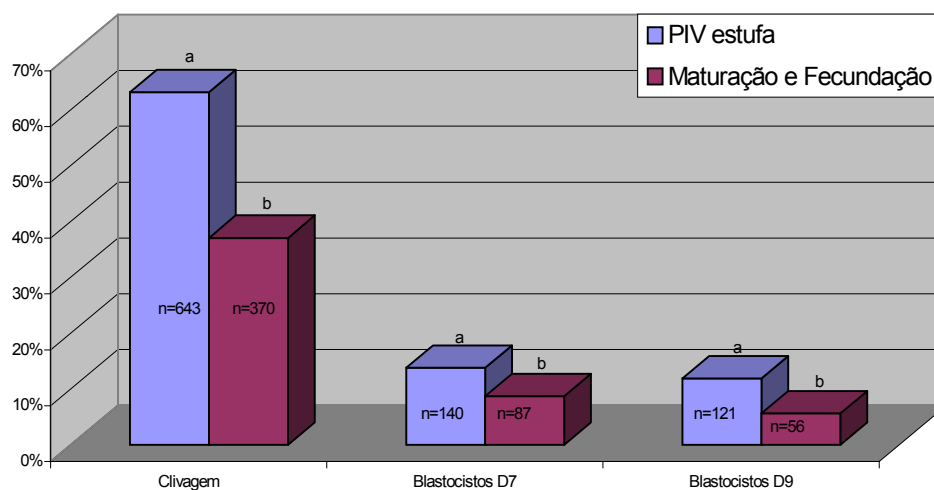
Na FIGURA 1 pode-se verificar que os 71,11% de clivagem (Experimento 1) obtidos com tubos gaseificados foi semelhante aos alcançados por KAISER *et al.* (1999) com criotubos gaseificados (76,5%) e superior aos relatados por De BEM e GUIADER (1990) com microcâmara de CO₂ em banho-maria (50,8%). A produção embrionária em D7 dos oócitos maturados em tubos previamente gaseificados e mantidos em banho-maria (26,46%) não diferiu (P>0,05) do grupo controle (27,54%), cuja produção *in vitro* ocorreu totalmente na estufa, porém as taxas obtidas por KAISER *et al.* (1999) foram menores (18,8%). A superioridade de produção obtida nesta pesquisa pode ser devida aos 25mM de HEPES adicionados ao meio de maturação, que possivelmente impediu modificações de pH, proporcionando maior competência na maturação e no desenvolvimento embrionário.

No experimento 2, a maturação e fecundação dos oócitos bovinos efetuada em tubos gaseificados e mantidos em banho-maria proporcionou percentuais de clivagem (37,0) e de desenvolvimento embrionário em D9 (3,6) estatisticamente inferiores (P<0,05; FIGURA 2) aos do grupo controle 63,1% e 8,6%, respectivamente. Estes resultados foram inferiores a outros sistemas como a mini-incubadora desenvolvida por AVERY e GREVE (1992), *bag system* (PALMA *et al.*, 1997), tubos de poliestireno (OLIVIER *et al.*, 1998), ou jarra para cultivo anaeróbico (AVERY *et al.*, 2000).

Em consequência dos baixos percentuais de produção embrionária verificados nos experimentos 1 e 2, optou-se por efetuar em tubos, somente o processo da fecundação (experimento 3), pois os baixos índices alcançados podem ser devidos ao tampão empregado no meio de fecundação constituído somente de bicarbonato.

Maturação e fecundação *in vitro* de óocitos bovinos em tubos previamente gaseificados e mantidos em banho-maria

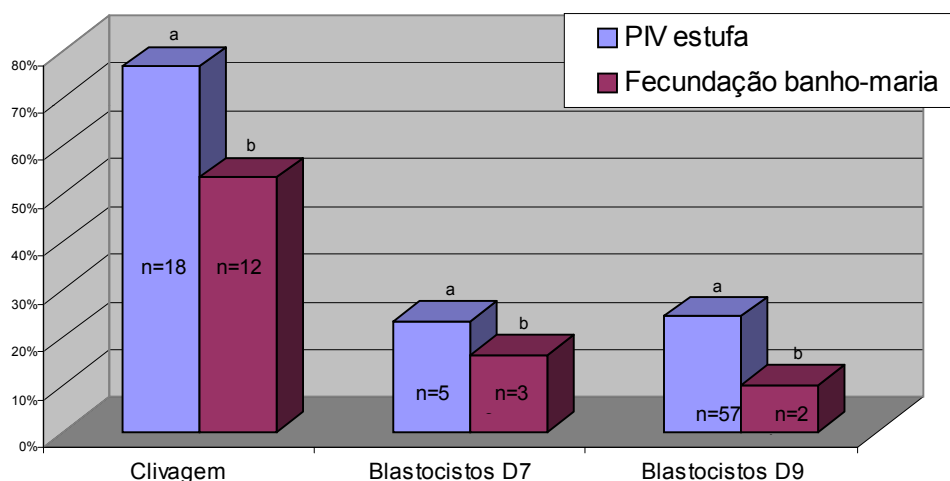
FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DA CLIVAGEM, BLASTOCISTOS EM D7 E D9, DE OÓCITOS BOVINOS MATURADOS E FECUNDADOS EM TUBOS MANTIDOS EM BANHO-MARIA. 2002.



Alguns embriões obtidos nos experimentos 1 e 2 apresentavam-se escuros no momento da avaliação em D7 e mesmo assim, alguns destes eclodiram. Segundo ENRIGHT *et al.* (2000), esta

aparência é atribuída à presença de gotas lipídicas. Possivelmente a atmosfera do tubo gaseificado na estufa e mantido no banho-maria por 16 a 20 horas proporcionou este aspecto.

FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DA CLIVAGEM, BLASTOCISTOS EM D7 E D9, DE OÓCITOS BOVINOS FECUNDADOS EM TUBOS MANTIDOS EM BANHO-MARIA. 2002.



Tanto a clivagem (53,33%) como o desenvolvimento embrionário em D9 (8,75%) obtidos com os CCO fecundados em tubos (Experimento 3; FIGURA 3), apresentaram uma queda significativa ($P < 0,05$), quando comparado com o grupo controle (76,6% e 17,87%),

respectivamente. Com metodologia semelhante, De BEM e NASSIBA (1990) efetuaram a fecundação em microcâmara com CO_2 com índices satisfatórios (67,5%) de clivagem. Acredita-se que no tratamento em questão, os resultados sejam devidos às alterações no pH do

meio de fecundação contido nos tubos gaseificados (2 horas), sem haver posteriormente o controle da atmosfera.

No experimento 1 (FIGURA 1), os CCO do grupo controle e do grupo tratamento foram fecundados em estufa não existindo diferença ($P < 0,05$) na produção embrionária. Já nos experimentos 2 e 3, a fecundação foi conduzida em tubos e houve diferença entre o grupo controle ($P < 0,05$) e os tratamentos, evidenciando que a diferença reside na etapa da fecundação. Neste caso, os CCO permaneceram nesse período submetidos a um ambiente diferenciado, com grande número de células espermáticas em elevado grau de metabolismo, o que pode ter alterado o pH do meio de fecundação. Ao contrário do meio de maturação, o meio não continha o tampão HEPES, o que pode ter permitido alterações durante a fecundação. A pesquisa de KESKINTEPE e BRACKETT (1996) com concentração de 10mM de HEPES no meio de fecundação *in vitro*, resultou em 85,2% de clivagem e 38,8% de blastocistos ao sétimo dia de desenvolvimento, demonstrando o efeito benéfico do tampão neste processo. Com base nestas observações, quando a fecundação em tubo por 18 horas é requerida sem o controle da atmosfera, para uso na OPU, recomenda-se uso de um tampão que reduza a variação de pH. Para isso existe a necessidade de uma melhor compreensão sobre a estabilidade do pH do meio de fecundação.

Conclusões

Oócitos bovinos maturados *in vitro* em tubos mantidos em banho-maria desenvolvem-se, são derivados e alcançam o estágio blastocisto de forma semelhante aos oócitos maturados em estufa em atmosfera com 5% de CO₂ e umidade saturada. A fecundação por 18 horas em tubos de 5ml, mantidos em banho-maria em meio Talp-Fert com bicarbonato de sódio, previamente equilibrado em estufa com 5% CO₂ por 2 horas, não é uma alternativa viável para a produção *in vitro* de embriões bovinos.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann do Lamic -UFSM, pelo apoio na produção dos meios. Ao Sr. José Carlos Medeiros Xavier pelos animais cedidos para obtenção do soro. À PECPLAN-ABS, Rosário do Sul(RS) pela assistência técnica e preparo do sêmen. Ao Frigorífico JG, de Caçapava do Sul(RS) e ao Frigorífico Silva, de Santa Maria(RS) pela cedência dos ovários para o estudo.

Referências

- AVERY, B.; GREVE, T. Impact of incubator type on the yield of *in vitro* produced bovine blastocysts. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Vanlose, v. 33, n. 4, p. 341-348, 1992.
- AVERY, B.; MELSTED, J.K.; GREVE, T. A novel approach for *in vitro* production of bovine embryos: use of the oxid atmosphere generating system. **Theriogenology**, New York, v. 54, n. 8, p. 1259-1268, 2000.
- De BEM, A.R.; GUIADER, C. Maturação *in vitro* de ovócitos bovinos em microcâmara de CO₂ em banho-maria. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO, 5., Brasília. **Anais...** SBTE, 1990. p. 103-105.
- De BEM, A.R.; NASSIBA, M. Fecundação *in vitro* de ovócitos bovinos em microcâmara de CO₂ em banho-maria. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO, 5., Brasília. **Anais...** SBTE, 1990. p. 98-100.
- De LOSS, F.; VAN VLIET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, Th. A.M. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, New York, v. 24, n. 2, p. 197-204, 1989.
- ENRIGHT, B.P.; LONERGAN, P.; DYNYES, A.; FAIR, T.; WARD, F.A.; YANG, X.; BOLAND, M.P. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: implications for early embryo development and quality. **Theriogenology**, New York, v. 54, n. 5, p. 659-663, 2000.
- KAISER, G.; ALBERIO, R.; BRUM, D.S.; BERNARDI, M.L.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B.; ALLER, J.; PALMA, G.A. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em criotubos e em estufa portátil. **Arquivos Faculdade Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v. 27, n. 1, p. 230, 1999. Suplemento.

- KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. *In vitro* developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 2, p. 333-339, 1996.
- KRUIP, A.M.; BONI, R.; WURTH, Y.A.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding cattle. **Theriogenology**, New York, v. 42, n. 4, p. 675-684, 1994.
- OLIVIER, N.S.; PALMA, G.A.; ALBERIO, R. *In vitro* production of bovine embryos in water bath. **Theriogenology**, New York, v. 49, n. p. 211, 1998.
- PALMA, G.A.; OLIVIER, N.; ALBERIO, R.; BREM, G. Effect of environmental conditions in the incubator on the development of *in vitro* produced bovine embryos. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 56, p. 530, n. 1, 1997. Supplement.
- PIETERSE, M.C.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, Th.A.M.; WURTH, Y.A.; VAN BENEDEN, Th.H.; WILLEMSE, A.H.; TAVERNE, M.A.M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 35, n. 4, p. 857-862, 1991.
- ROBERTSON, I.; NELSON, R.E. Certificação e identificação de embriões. In: Stringfellow, D. A. & Seidel, S. M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**, 3. ed. Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1999. cap. 9, p. 109-140.
- SANTL, B.; WENIGERKIND, H.; SCHERNTHANER, W.; MÖDL, J.; STOJKOVIC, M.; PRELLE, K.; HOLTZ, W.; BREM, G.; WOLF, E. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in simmental heifers. **Theriogenology**, New York, v. 50, n. 1, p. 89-100, 1998.
- VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The submarine incubation system, a new tool for *in vitro* embryo culture: a technique report. **Theriogenology**, New York, v. 48, n. 8, p. 1379-85, 1997.
- WANG, W.L.; JIANG, H.S.; LU, K.H.; GORDON, I.; POLGE, C. The effect of gas phase on the *in vitro* development of bovine embryos derived from *in vitro* maturation and fertilization of ovarian oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 37, n. 1, p. 320, 1992.

Recebido para publicar: 20/06/2002

Aprovado: 25/08/2002