

**VOLUME DE MEIO E NÚMERO DE OÓCITOS PARA FECUNDAÇÃO
NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS**
*(Volume of medium and number of oocytes for fertilization
in the in vitro production of bovine embryos)*

**BRUM, D.S.¹; LEIVAS, F.G.¹; NOEBAUER, M.R.³; BERNARDI, M.L.²;
SILVA, C.A.M.³; RUBIN, M.I.B.³**

¹Médico Veterinário, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS;

²Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, UFRGS. 91.540-000 Porto Alegre, RS;

³Embryolab, Laboratório de Embriologia Animal, Hospital Veterinário, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. danisbrum@yahoo.com.br or embryolab@www.ufsm.br.

RESUMO – A origem dos Complexos Cumulus-Oócitos (CCO) bovinos e os diferentes protocolos entre equipes geram variações nos índices de produção in vitro (PIV). O processo pode ser influenciado pelo número de CCO e volume das gotas de maturação, fecundação e cultivo. Neste estudo, avaliou-se a densidade de CCO e o volume de meio de fecundação sobre a PIV com 672 oócitos bovinos. A maturação in vitro (MIV) foi conduzida com 20 CCO em 200µL de TCM-199+rFSHh+10% de soro de vaca em estro (SVE), por 24h, em estufa a 39°C, 5% CO₂ em ar e umidade saturada. Na fecundação (Dia 0 =D0) utilizou-se 5, 10 ou 20 CCO e 2 volumes de meio (1:5 e 1:10), num fatorial 3x2, em 6 repetições. O sêmen foi selecionado por migração ascendente e para a fertilização (1x10⁶ espermatozoides/mL) os gametas foram incubados em Fert-Talp, por 18h. O cultivo foi em grupos de 20 zigotos, em 200µL de fluido sintético do oviduto (SOF) aaci+5%SVE, por 8 dias e as avaliações em D2 (clivagem), D7 (Blastocistos), D9 (Blastocistos expandidos, em eclosão e eclodidos). As taxas de clivagem (80, 85 e 87%), embriões em D9 (23, 27 e 28%) e de eclosão (42, 37 e 48%) foram semelhantes (P>0,05) para 5, 10 ou 20 CCO, respectivamente. Não houve diferença (P>0,05) na clivagem (83 e 85%), embriões em D9 (24 e 28%) e eclosão (41 e 44%) entre as proporções 1:5 e 1:10µL. A produção de blastocistos e taxa de eclosão em D9 não são influenciados pelo número de CCO, nem pela proporção de CCO por volume de meio na fecundação.

Palavras chave: embrião bovino, volume, número, PIV.

ABSTRACT – The origin of the bovine Cumulus Oocytes Complexes (COC) and the different protocols among teams are responsible for the variation rates of the in vitro production (IVP). The process is also influenced by COC number and by the volume of the drop in the maturation, fertilization and culture. In this study, the effect of bovine COC density per drop medium and the fertilization medium volume were evaluated during the bovine IVP using 672 COC. The in vitro maturation was performed with 20 COC in 200µL of TCM-199+rFSHh+10% estrus cow serum (ECS), for 24h in an incubator with 5%CO₂ in air, saturated humidity, at 39°C. For the fertilization (Day 0 = D0) 5, 10 or 20 COC and 2 volumes ratio of medium (1:5 and 1:10) were used in a factorial outline 3x2, in 6 replications. Thawed semen was prepared by a swim up process and for the fertilization (1x10⁶ spermatozoa/ml) the gametes were maintained in Fert-Talp for 18h. Groups of twenty presumed zygotes were cultured in 200µL synthetic oviduct fluid (SOFaaci)+5% ECS, for 8 days. The evaluations were carried out in D2 (cleavage), D7 (blastocysts) and D9 (expanded and hatched blastocysts). The rates of cleavage (80, 85 and 87%), embryos in D9/ D2 (23, 27 and 28%) and hatched blastocysts in D9/D7 (42, 37 and 48%) were similar (P>0.05) for 5, 10 and 20 COC, respectively. No difference was observed in cleavage (83 and 85%), embryos in D9 (24 and 28%) and hatching rates (41 and 44%) for 1:5 and 1:10µL of fertilization medium. Blastocysts production and the hatching rate in D9 were neither influenced by the COC number, nor by the proportion of COC per medium volume used during fertilization.

Key words: bovine embryo, volume, number, IVP, SOF

Introdução

O volume de meio de cultivo e a densidade de oócitos/embriões utilizados durante a produção *in vitro* (PIV) são bastante variáveis. Embora se saiba que o cultivo em grupos é benéfico para o desenvolvimento embrionário, tanto no cultivo dos zigotos (O'DOHERTY *et al.*, 1997; AHERN e GARDNER, 1998; PALASZ e THINDATHIL, 1998; WARD *et al.*, 2000; YUAN *et al.*, 2000), como na maturação de oócitos (O'DOHERTY *et al.*, 1997). É possível obter embriões em sistemas de onde toda a PIV é realizada individualmente (BLONDIN *et al.*, 1997; HOLM *et al.*, 2000; FUKUI *et al.*, 2000; VAJTA *et al.*, 2000). Durante o cultivo *in vitro* os embriões secretam diferentes fatores de crescimento que proporcionam melhores índices de produção, através de sua ação autócrina e parácrina. Estudos realizados em diferentes espécies sugerem que a redução do volume de cultivo pode proporcionar maior concentração desses fatores, proporcionando maior desenvolvimento embrionário (PARIA e DEY, 1990; GARDNER *et al.*, 1994). Para a maturação, usualmente são utilizados volumes maiores de meio, provavelmente devido à alta concentração de células do Cumulus oophorus que são cultivadas simultaneamente com os Complexos cumulus-oócitos (CCO). No entanto, durante a maturação e fecundação (FIV) não existem estudos específicos para volume de meio ou densidade de oócitos por gota, o que seria importante, pois durante a FIV, além dos CCO, as exigências espermáticas também devem ser consideradas.

Um sistema de FIV ótimo deve proporcionar altas taxas de penetração, com um mínimo de fecundações anormais. Diversos sistemas são utilizados atualmente buscando otimizar os índices de fecundação. A adição de substâncias para promover a capacitação espermática como heparina, hipotaurina, penicilina e epinefrina têm sido utilizadas em diferentes concentrações, há vários anos, em protocolos do mundo inteiro (PARRISH *et al.*, 1986). Nas raças européias, a concentração espermática e o tempo de incubação têm variado entre 0,5 e 5 x 10⁶ espermatozoides/mL (LONG *et al.*, 1994; PARRISH *et al.*, 1995) e entre 16 e 24 horas (HASLER *et al.*, 1995; GALLI e LAZZARI, 1996), respectivamente. A polispermia tem sido a mais

freqüente das fecundações anormais na FIV (SAEKI *et al.*, 1991). Outra alteração que pode ocorrer durante a FIV é a diminuição do potencial de desenvolvimento do oócito, provocado por enzimas hidrolíticas liberadas pelos espermatozoides. Um volume adequado de meio durante a FIV, assim como uma concentração espermática adequada viria reduzir este problema, visto que acontece quando os oócitos são incubados com grande número de espermatozoides em um pequeno volume de meio (REHMAN *et al.*, 1994).

Este estudo teve como objetivo determinar a influência do número de oócitos e do volume da gota de meio utilizados durante a fecundação na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Material e Métodos

Os embriões foram produzidos a partir de complexos cumulus-oócitos (CCO) de ovários de bovinos abatidos em matadouros e transportados até o laboratório à temperatura ambiente (22-25°C; YANG *et al.*, 1990), em solução fisiológica a 0,9% de NaCl¹ acrescida de 100mg de estreptomicina¹ e 50.000UI de penicilina G-potássica¹ para um litro de solução, em tempo não superior a quatro horas após o término do abate. Os folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm foram puncionados com o auxílio de uma bomba de vácuo² e os CCO aspirados foram mantidos em líquido folicular para a busca sob estereomicroscópio. Após a identificação, os CCO foram imediatamente selecionados de acordo com o aspecto morfológico dos complexos cumulus-oócitos, conforme o critério de avaliação descrito por DELOSS *et al.* (1989).

A maturação foi realizada em grupos de 20 oócitos em 200µL de TCM-199⁴ modificado, adicionado de 5,95mg/mL de HEPES¹, 0,025mg/mL de piruvato de sódio¹, 0,01UI de rFSHh/mL⁵, 0,5µg/mL de LH⁶ e 10% de soro de vaca em estro (SVE), por 22 a 24h em estufa de cultivo⁷ a 39°C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. A fecundação foi efetuada após a distribuição aleatória dos CCO maturados em um delineamento fatorial 3x2, no qual foi avaliado o efeito de três grupos de CCO (5, 10 e 20 CCO) e de 2 proporções de volume de meio (1:5 e 1:10 CCOS:µL).

Para fecundação foi utilizado sêmen de um touro *Bos taurus* congelado em palhetas de 0,5mL. Após o descongelamento a 39°C por 20 segundos, o sêmen foi selecionado por migração ascendente em meio TALP-SPERM (PARRISH *et al.*, 1986) + 0,06mg/mL BSA¹ + 0,11mg/mL de piruvato de sódio. Os CCO foram inseminados (1×10^6 espermatozoides/mL) em meio TALP-FERT (PARRISH *et al.*, 1986) com 0,06mg/mL de BSA, 0,022mg/mL de piruvato de sódio e heparina¹ e mantidos em estufa de cultivo⁷ a 39°C com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada, por 18 a 22 horas.

Após este período, os supostos zigotos foram desnudados por agitação mecânica em vórtex⁸, cultivados em grupos de 20 CCO em 200µL de meio de cultivo SOFaaci (HOLM *et al.*, 1999) contendo 5% de soro de vaca em estro, onde permaneceram por 8 dias, sob óleo mineral, mantidos em estufa a 39°C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

Considerando-se a data da fecundação como dia zero (D0), efetuou-se a avaliação das taxas de clivagem, blastocistos e eclosão nos dias 2 (D2), 7 (D7) e 9 (D9), respectivamente.

Os percentuais de clivagem e de blastocistos

foram submetidos à transformação arcoseno raiz quadrada e análise de variância (SAS, 1998). O efeito do dia de realização da rotina de PIV foi considerado e mantido no modelo de análise quando significativo. Os percentuais médios foram comparados pelo teste de Tukey, em nível de 5% de significância. A taxa de eclosão foi analisada e comparada pelo teste de Qui-quadrado.

Resultados

Não houve efeito da interação entre o número de oócitos e volume de meio ($P > 0,05$), sendo os resultados comparados de acordo com o número de CCO ou volumes de meio. Não houve diferença ($P > 0,05$) na clivagem, produção de blastocistos em D7, D9 e eclosão, independente do número de CCO (5, 10 ou 20) utilizados na fecundação (FIGURA 1). A redução no volume de meio (1:5µL) durante a fecundação resultou em menor produção de blastocistos em D7 ($P < 0,05$), mas a produção de blastocistos em D9 e a eclosão foram semelhantes às observadas com volume maior (FIGURA 2).

FIGURA 1 – PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS COM DIFERENTES NÚMEROS DE COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS (CCO) NO MEIO DE FECUNDAÇÃO.

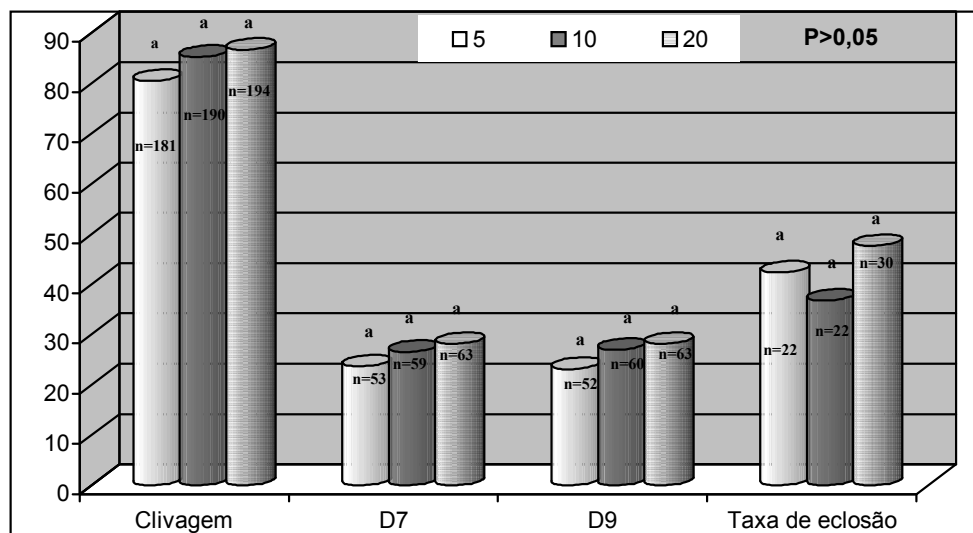
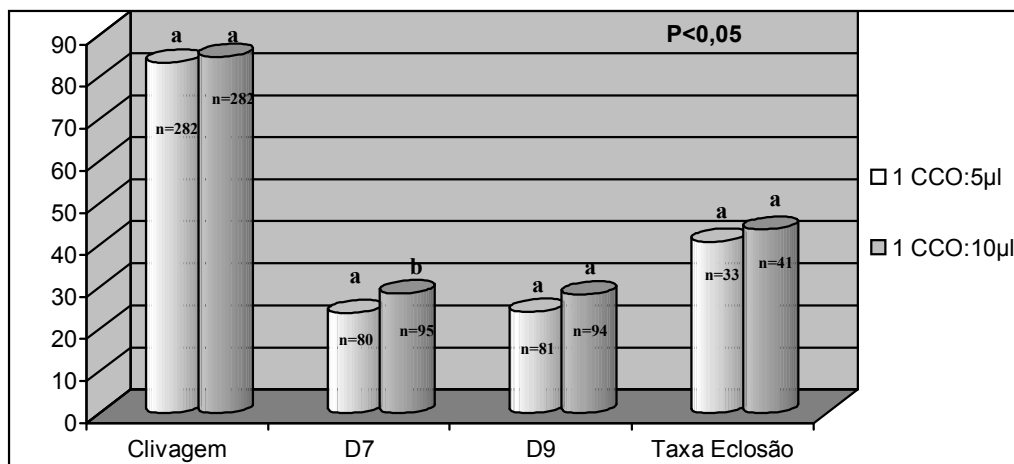


FIGURA 2 – PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE VOLUME DE MEIO NA FECUNDAÇÃO.



Discussão

A possibilidade de utilizar um reduzido número de oócitos por gota de fecundação seria importante para animais que apresentam baixa recuperação de CCO, ou mesmo uma alternativa para a utilização de mais de um acasalamento por doadora, sem interferir nos índices de produção. No presente trabalho foi demonstrado que o número de oócitos utilizados por gota durante a FIV não influenciou os índices de produção de blastocistos, embora tenha havido tendência para a clivagem do grupo de 5 ser menor que a do grupo de 20 oócitos ($P < 0,07$). FUKUI *et al.* (2000) também obtiveram bons índices de produção embrionária ao realizarem a FIV em grupos de 5 CCO, ou mesmo individual, embora eles não os tenham comparado com a FIV em grupos com maior número de CCO. Estes resultados sugerem que, durante a FIV, há comportamento diferente do relatado para a maturação ou cultivo, durante os quais o número reduzido de CCO/embriões resulta em menores índices de produção (O'DOHERTY *et al.*, 1997; AHERN *et al.*, 1998; PALASZ e THINDATHIL, 1998; WARD *et al.*, 2000; YUAN *et al.*, 2000). Já em suínos, quando foi avaliada a influência do número de CCO por gota de FIV, foi constatado melhor resultado com o uso de grupos maiores (25 ou 50 vs 15; GIL *et al.*, 2003).

Com a aplicação comercial da OPU, cresce o interesse por trabalhos visando melhor aproveitamento do sêmen, pela redução do volume da gota de FIV, sem interferir nos índices de

fecundação. Em nosso estudo, a produção de blastocistos em D9 e a taxa de eclosão não foram afetados pelo volume de meio no co-cultivo de espermatozoides e oócitos durante a fecundação in vitro. FUKUI *et al.* (2000) observaram que o índice de fecundação não é afetado por uma relação de volume até 1 CCO:5µL de meio. Com a relação 1 CCO:2µL de meio, os resultados foram inferiores, embora tenham obtido maiores taxas de fecundação normal. Trabalhos realizados com suínos demonstraram bons índices de fecundação e produção de embriões com volumes reduzidos de meio, até 2µL por oócito, utilizando uma concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL (GIL *et al.*, 2003). Em nosso trabalho, a atmosfera gasosa utilizada na fecundação foi de 5% de CO₂ em ar, sem controle do O₂. A utilização de uma tensão reduzida de oxigênio (5%), convencionalmente empregada durante o cultivo in vitro, vem sendo utilizada com sucesso também na fecundação in vitro, sugerindo melhor eficiência na capacidade fecundante de alguns touros sob essas condições (GALLI *et al.*, 2001; LAZZARI *et al.*, 1998). Em sistemas onde o O₂ é controlado (5%) na FIV, ou utilizam-se outras concentrações espermáticas, aspectos como densidade de oócitos e volume de meio devem ser criteriosamente avaliados.

Conclusões

A produção de blastocistos em D9 e a taxa de eclosão não são influenciados pelo número de oócitos nem pela proporção de meio utilizado na fecundação in vitro.

Fontes de aquisição

¹Sigma Chemical CO., USA.

²Nevoni Equipamentos Odonto Médico Hospitalar Ltda. São Paulo, SP. Brasil.

³Carl Zeiss – 73446 Oberkochen, Alemanha.

⁴Gibco BRL - Grand Island USA, NY.

⁵Serono Pharma.

⁶Lutogen - AUSA International Inc., USA.

⁷W.C. Heraeus GmbH. Hanau 1, Alemanha.

⁸Fischer Scientific US.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann do LAMIC (UFMS) pelo apoio à pesquisa, à PECPLAN-ABS Rosário do Sul, RS, pela assistência técnica/auxílio no preparo do sêmen, aos Frigoríficos Silva (Santa Maria) e JG (Caçapava do Sul) que gentilmente cederam os ovários bovinos para este estudo.

Referências

AHERN, T.J.; GARDNER, D.K. Culturing bovine embryos in groups stimulates blastocyst development and cell allocation to the inner cell mass. **Theriogenology**, New York, v.49, n.1, p.194, 1998.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.A. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, New York, v.47, n.5, p.1061-1075, 1997.

DELOSS, F.; VAN VLIET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, T.A. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, v.24, n.2, p.197-204, 1989.

FUKUI, Y.; KIKUCHI, Y.; KONDO, H.; MIZUSHIMA, S. Fertilizability and developmental capacity of individually cultured bovine oocytes. **Theriogenology**, New York, v.53, n.8, p.1553-1565, 2000.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, New York, v.55, n.6, p.1341-1357, 2001.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, New York, v.42, n.1-4, p.371-379, 1996.

GARDNER, D.K.; LANE, M.; SPITZER, A.; BATT, P.A. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. **Biology Reproduction**, Madison, v.50, n.2, p.390-400, 1994.

GIL, M.A.; ABEYDEERA, L.R.; DAY, B.N.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.A. Effect of the volume of medium and number of oocytes during in vitro fertilization on embryo development in pigs. **Theriogenology**, New York, v.60, n.4, p.767-76, 2003.

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEM, P.J.; JIN, Z.Q.; MCCAULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, New York, v.43, n.1, p.141-152, 1995.

HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, New York, v.52, n.4, p.683-700, 1999.

HOLM, P.; VAJTA, G.; BOOTH, P.J. In vitro production of bovine embryos cultured in groups in wells or singly in the wow-system in a defined or undefined SOFaa medium. **Theriogenology**, New York, v.53, n.1, p.296, 2000.

LAZZARI, G.; CROTTI, G.; DUCHI, R.; NOTARI, C.; GALLI, C. Lowering the oxygen level during IVF improves the fertilizing ability of bovine sperm and does not affect the developmental capacity of the embryos obtained. In: RÉUNION OF ASSOCIATION EUROPEENNE DE TRANFERT EMBRYONNAIRE, 14., 1998, Venice. **Proceedings...** Venice, 1998. p.198.

LONG, C.R.; DMIANI, P.; PINTO-CORREIA, R.A.; DUBY, R.T.; ROBL, J.M. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured in vitro under various conditions of fertilization. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.102, n.2, p.361-369, 1994.

O'DOHERTY, E.M.; WADE, M.G.; HILL, J.L. Effects of culturing bovine oocytes either singly or in groups on development to blastocysts. **Theriogenology**, New York, v.48, p.161-169, 1997.

PALASZ, A.T.; THINDATHIL, J. The effect of volume of culture medium and embryo density on in vitro development of bovine embryos. **Theriogenology**, New York, v.49, n.1, p.212, 1998.

PARIA, B.C.; DEY, S.K. Pre implantation embryo development in vitro: cooperative interaction among embryos and role of growth factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, n.7, p.4756-4760, 1990.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, New York, v.44, n.6, p.859-869, 1995.

PARRISH, J.J.; SUSKO, P.J.L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRITSER, E.S; EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, New York, v.25, n.4, p.591-600, 1986.

REHMAN, N.; COLLINS, A.R.; SUH, T.K.; WRIGHT, R.W. Effect of exposure time on in vitro fertilization and embryo development of oocytes matured in vitro. **Theriogenology**, New York, v.41, n.7, p.1447-1452, 1994.

SAEKI, K.; KATO, H.; HOSOI, Y.; MIYAKE, M.; UTSUMI, K.; IRITANI, A. Early morphological events of in vitro fertilized bovine oocytes with frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v.35, n.5, p.1051-1058, 1991.

SAS Institute (Cary NC) SAS user's guide: Statistical Analysis System, Release 6.12, 1998.

VAJTA, G.; PEURA, T.T.; HOLM, P.; PÁLIDA, A.; GREVE, T.; CALLESEN, H.; TROUNSON, A.O. A new method for individual embryo culture: the well of the well (WOW) system. **Theriogenology**, New York, v.53, n.1, p.304, 2000.

WARD, F.A.; ENRIGHT, B.P.; BOLAND, M.P. Effect of group size and oocyte to medium volume post-fertilization on the development of bovine embryos in vitro. **Theriogenology**, New York, v.53, n.1, p.306, 2000.

YANG, N.S.; LU, K.H.; GORDON, I. In vitro fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from ovaries storage. **Theriogenology**, New York, v.33, n.1, p.352, 1990.

YUAN, Y.Q.; Van SOOM, A.; LAEVEENS, H.; COOPMAN, F.; PEELMAN, L.; KRUIF, A. Single embryo culture affects hatching rate in bovine in vitro produced embryos. **Theriogenology**, New York, v.53, n.1, p.307, 2000.

Recebido para publicação: 05/04/2004

Aprovado: 10/09/2004