

## UTILIZAÇÃO DE UM SISTEMA COMPLETAMENTE PORTÁTIL NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

*(Use of a completely portable in vitro system in production of bovine embryos)*

João Victor da Silva ALBUQUERQUE\*, Camila Muniz CAVALCANTI,  
Iana Sales CAMPELO, Mirelly Mirna Alves de SOUZA; Luciana  
Magalhães MELO; Vicente José de Figueiredo FREITAS

Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária (UECE). Av. Dr. Silas Munguba, 1700.  
Campus Itaperi, Fortaleza, Ce. CEP:60.740-000. \*E-mail: [victor.albuquerque@aluno.uece.br](mailto:victor.albuquerque@aluno.uece.br)

### RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos no Brasil é dependente de transporte de oócitos das fazendas para laboratórios, sendo útil um sistema de incubação que mantenha a competência ao desenvolvimento. Assim, comparou-se a dois sistemas de incubação (mini vs portátil) quanto à qualidade dos embriões produzidos. Oócitos bovinos foram maturados, fecundados e cultivados *in vitro*. Além disso, foi verificada a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). As taxas de clivagem e blastocisto foram similares ( $p > 0,05$ ) para ambos os sistemas. Os níveis de EROs foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) em embriões de dia 2 produzidos na incubadora mini. Em conclusão, o sistema de incubação portátil mostrou ser uma alternativa viável para PIVE bovina.

**Palavras-chave:** Espécies reativas de oxigênio, incubadora, PIVE.

### SUMMARY

The *in vitro* production of bovine embryos (PIVE) in Brazil, is dependent on oocyte transport from farms to laboratories, and an incubation system that maintains developmental competence is useful. Thus, it was compared to two incubation systems (mini vs portable) regarding the quality of the embryos produced. Bovine oocytes were matured, fertilized and cultured *in vitro*. In addition, the production of reactive oxygen species (ROS) was verified. The cleavage and blastocyst rates were similar ( $p > 0.05$ ) for both systems. ERO levels were significantly higher ( $p < 0.05$ ) in day 2 embryos produced in the mini incubator. In conclusion, the portable incubation system proved to be a viable alternative for bovine PIVE.

**Key words:** Reactive oxygen species, incubator, PIVE.

### INTRODUÇÃO

A maior parte da produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos no Brasil depende de um sistema de colheita de oócitos em fazendas, posterior transporte para laboratórios e subsequente maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV).

\*Endereço para correspondência:  
[victor.albuquerque@aluno.uece.br](mailto:victor.albuquerque@aluno.uece.br)

Há uma tendência na utilização de sistemas de incubação com câmaras menores, havendo um retorno rápido às condições ideais de cultivo e uma economia da mistura de gases (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>) (LEE *et al.*, 2013). Além disso, um sistema completamente portátil de cultivo poderia diminuir custos e tornar mais simples e prática a PIVE bovina para posterior transferência para receptoras ou criopreservação dos embriões. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção quanti-qualitativa de embriões bovinos produzidos em dois sistemas de incubação: mini bancada (MINI) ou portátil (PORT) comparando as taxas de clivagem, blastocistos e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Bioética e desenho experimental

Esse estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA/UECE n° 4024452-2017). Oócitos/embriões bovinos foram submetidos à MIV, FIV e CIV em dois grupos experimentais de incubação: mini bancada - MINI (Eve, WTA, Cravinhos, Brasil) e portátil (LabMix, WTA), ambas com baixa tensão de CO<sub>2</sub> (5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>).

### Colheita dos oócitos e MIV

Os ovários foram obtidos em abatedouros e transportados em garrafa térmica contendo solução salina com antibiótico a 38 °C. Ao chegar no laboratório os folículos entre 2 e 8 milímetros foram aspirados utilizando agulhas de 18G acopladas a seringas de 10 mL. Os complexos *cumulus*-oócito (CCOs) foram selecionados sob estereomicroscópio (SMZ800, Nikon Co., Tóquio, Japão), sendo utilizados para MIV somente aqueles com três camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo. Para a MIV, os CCOs foram lavados em meio TCM-199 suplementado com HEPES (H-HEPES) e distribuídos em grupos de 50 estruturas por poço, que continha 500 µL de meio de maturação. Os CCOs foram incubados por 22h em 38,5 °C em cada sistema de incubação.

### FIC e CIV

Para a FIV foi utilizado sêmen de um touro com fertilidade comprovada. As palhetas de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 25 segundos, seguido por três centrifugações (700g por 25 min, 500g por 10 min e 400g por 10 min) em meio BO (BRACKETT e OLIPHANT, 1975) suplementado com 20 UI/mL de heparina e 5mM de cafeína (Calbiochem, San Diego, CA, EUA), com posterior diluição em meio BO contendo 20mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) para atingir a concentração de 20 x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. Os CCOs maturados foram lavados com meio H-TCM e depois incubados em gotas de 100 µL de espermatozoides cobertas com óleo mineral em cada incubadora. Depois de 6 horas de incubação, os presumíveis zigotos foram desnudados no vortex, lavados no H-TCM e transferidos para poços contendo 500 µL de fluido sintético

\*Endereço para correspondência:  
[victor.albuquerque@aluno.uece.br](mailto:victor.albuquerque@aluno.uece.br)

de oviduto (SOF) coberto com óleo mineral. Os prováveis embriões foram cultivados por oito dias a 38,5 °C em cada incubadora, sendo avaliadas as taxas de clivagem no dia 2 (D2) e as taxas de embriões no dia 7 (D7).

### **Níveis de EROs**

Para a análise das EROs foi utilizada a sonda diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA) diluída em meio DMSO. Os oócitos e embriões foram incubados por 30 minutos em 10 µM de H<sub>2</sub>DCFDA com DMSO em gotas de 50 µL de tampão fosfato e álcool polivinílico nas incubadoras testadas. Depois da incubação, as estruturas foram lavadas e analisadas sob microscópio óptico invertido (Eclipse TE2000, Nikon) com filtro GFP (450-490 nm) após dois segundos de exposição à luz UV. As unidades arbitrárias de fluorescência (UAFs) foram medidas utilizando o software Infinity Analyze (Lumenera Co., Ottawa, Canadá).

### **Análise estatística**

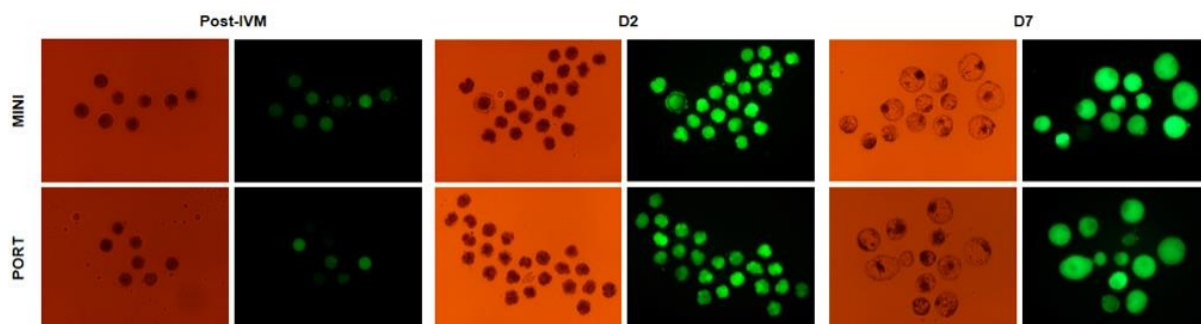
A análise das taxas de clivagem e de blastocistos foi feita por ANOVA *one-way* e os níveis de EROs foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, ambos com significância de 5%.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Para a análise das taxas de produção embrionária, foram realizadas 19 replicatas, resultando em um total de 1158 presumíveis zigotos cultivados. Comparando as taxas de clivagem, os grupos MINI (65,0%) e PORT (59,5%) não apresentaram diferença estatística ( $p > 0,05$ ). O mesmo comportamento foi observado em relação à taxa de blastocistos (32,3% e 21,9%,  $p > 0,05$ ) e de blastocistos eclodidos (59,9% e 46,0%,  $p > 0,05$ ).

Selecionados aleatoriamente de cada grupo, oócitos foram comparados quanto a produção de EROs, não observando diferença estatística entre os grupos (variando entre 29,4 e 37,6). Em embriões D2, o nível de EROs (UAFs±EPM) foi significativamente superior ( $p < 0,05$ ) no grupo MINI (44,2±3,1) em comparação ao PORT (33,3±3,2) (Fig. 1). Para o estágio de blastocisto, não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) nas taxas de EROs entre as duas incubadoras, porém foram as taxas mais elevadas encontradas (variando entre 43,3 e 48,1). Sabe-se que a produção de EROs é fisiológica, participando de vários estágios do desenvolvimento embrionário, não só relacionados a efeitos prejudiciais (HARVEY *et al.*, 2002). O balanço redox faz com que os níveis sejam propícios para sinalizações intracelulares, mediando diversas funções celulares (KHAZAEI e AGHAZ, 2017). Entretanto, as taxas elevadas de EROs no D2, observados no sistema MINI, não afetaram o desenvolvimento até a fase de blastocisto.

\*Endereço para correspondência:  
[victor.albuquerque@aluno.uece.br](mailto:victor.albuquerque@aluno.uece.br)



**Figura 1:** Imagens representativas ( $\times 100$ ) de oócitos pós-MIV e embriões (D2 e D7) cultivados nos sistemas mini bancada (MINI) e portátil (PORT) e corados com H<sub>2</sub>DCFDA.

**Obs.:** As imagens em campo claro (coluna esquerda) e fluorescência (coluna direita) são mostradas para cada estágio de desenvolvimento.

## CONCLUSÕES

Concluimos que o sistema de incubação portátil é capaz de produzir embriões a taxas aceitáveis tanto quanto o sistema de bancada. Assim, a utilização de um sistema portátil com atmosfera controlada pode ser uma alternativa eficiente para poupar tempo adiantando etapas e manter a qualidade dos gametas femininos e embriões em longas viagens sem produzir EROs em quantidades que afetem o desenvolvimento dos mesmos.

## REFERÊNCIAS

- BRACKETT, B.G.; OLIPHANT, G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction*, v.12, p.260-274, 1975.
- HARVEY, A.J.; KIND, K.L.; THOMPSON, J.G. REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction*, v.123, p.479-486, 2002.
- KHAZAEI, M., AGHAZ, F. Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during in vitro maturation of oocytes. *International Journal of Fertility and Sterility*, v.11, p.63-69, 2017.
- LEE, M.; GRAZI, R.; SEIFER, D. Incorporation of the K-Minc incubator and media system into the IVF lab: the future of IVF. *Journal of Clinical Embryology*, v.13, p.21-32, 2013.

\*Endereço para correspondência:  
[victor.albuquerque@aluno.uece.br](mailto:victor.albuquerque@aluno.uece.br)