

## EFEITO DE DIFERENTES SISTEMAS DE MATURAÇÃO E CULTIVO SOBRE A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

*(Effect of different maturation and growth systems on in vitro production of bovine embryos)*

Mirelly Mirna Alves de Sousa SILVA<sup>1\*</sup>; Camila Muniz CAVALCANTI<sup>2</sup>;  
Iana Sales CAMPELO<sup>2</sup>; João Victor da Silva ALBUQUERQUE<sup>2</sup>;  
Luciana Magalhães MELO<sup>2</sup>; Vicente José de Figueirêdo FREITAS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde (UECE). Av. Dr. Silas Munguba, 1700.  
Campus Itaperi, Fortaleza, Ce. CEP: 60.740-000; <sup>2</sup>Faculdade de Veterinária (UECE).

\*E-mail: [alves.mirelly.96@gmail.com](mailto:alves.mirelly.96@gmail.com)

### RESUMO

O objetivo desse estudo foi comparar dois diferentes sistemas de incubação (incubadora convencional – CONV e minibancada – MINI) sobre a produção *in vitro* de embriões (PIVE) de bovinos. Para tanto, complexos *cumulus*ócito (CCOs) foram submetidos a maturação *in vitro* e posterior fecundação e cultivo *in vitro* em ambos os sistemas. As estruturas foram avaliadas pós-maturação e pós-cultivo, para avaliação de maturação nuclear e quantidade de células/blastocisto, respectivamente. Não foram observadas diferenças estatísticas ( $p > 0,05$ ) nos diferentes parâmetros estudados. Concluímos que ambos os sistemas testados demonstraram ser eficientes para PIVE de bovinos.

**Palavras-chave:** Bovino, embriões, tensão de oxigênio.

### SUMMARY

The objective of this study was to compare two different incubation systems (conventional incubator - CONV and minibank - MINI) on the *in vitro* production of bovine embryos (PIVE). For this purpose, cumulus cytotoxic complexes (CCOs) were submitted to *in vitro* maturation and subsequent fertilization and *in vitro* culture in both systems. The structures were evaluated post-maturation and post-culture, for evaluation of nuclear maturation and amount of cells / blastocyst, respectively. No statistical differences ( $p > 0.05$ ) were observed in the different parameters studied. We conclude that both tested systems proved to be efficient for bovine PIVE.

**Key words:** Bovine, embryos, oxygen tension.

### INTRODUÇÃO

A bovinocultura brasileira é um dos setores mais importantes do agronegócio e, conseqüentemente, da economia nacional. O Brasil possui o maior rebanho comercial e ocupa o segundo efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças. Além disso, desde 2004, o Brasil é o líder na exportação de carne bovina, segundo maior produtor de carne e sexto produtor mundial de leite (BRASIL, 2017).

\*Endereço para correspondência:  
[alves.mirelly.96@gmail.com](mailto:alves.mirelly.96@gmail.com)

Nesse contexto, as biotécnicas aplicadas à reprodução animal têm contribuído fortemente para o desenvolvimento da exploração de bovinos. Dentre estas biotécnicas, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido utilizada para acelerar a produção de animais geneticamente superiores, impedir o descarte precoce de fêmeas de alto valor zootécnico e preservar raças ou linhagens importantes (GONÇALVES *et al.*, 2008).

O Brasil é líder mundial na PIVE em bovinos desde 2013 (IETS, 2013), e, apesar do aumento na demanda e na acessibilidade dessa biotécnica, as taxas de mortalidade embrionária precoce prejudicam a eficácia do procedimento e quaisquer vantagens econômicas associadas. Embora a maioria das estruturas produzidas *in vitro* apresentem boas taxas de clivagem, apenas 30 a 40% dos zigotos desenvolvem até o estágio de blastocisto (LONERGAN *et al.*, 2006), sugerindo que fatores que atuam nessa etapa influenciam as taxas de viabilidade embrionária.

Há evidências de que as condições ambientais em que os embriões são expostos durante a PIVE podem afetar sua qualidade. Por esse motivo, esforços vêm sendo realizados para se obter métodos de cultivo cada vez menos prejudiciais aos oócitos e embriões (RIZOS *et al.*, 2003; YUAN *et al.*, 2003).

Desta forma, esse trabalho objetivou verificar a eficiência de dois diferentes sistemas de incubação (incubadora de bancada convencional com oxigênio elevado e mini-incubadora de bancada com baixa tensão de oxigênio) durante a PIVE em bovinos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da UECE (CEUA/UECE nº 4024452/2017). Para as etapas da PIVE, ou seja, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), os oócitos/embriões foram submetidos a dois grupos experimentais ou sistemas de incubação: incubadora convencional de bancada (CONV) (Thermo-Forma, Thermo Fischer, Waltham, EUA) com elevada tensão de oxigênio (20% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> no ar) e mini incubadora de bancada (MINI) (Eve, WTA, Cravinhos, Brasil) com baixa tensão de oxigênio (5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub>).

Para realização do experimento, ovários bovinos foram colhidos em abatedouro local e transportados ao laboratório em vasilhame térmico contendo solução salina adicionada de antibióticos. Os folículos, entre 2 a 8 mm de diâmetro, foram aspirados com agulha (18G) acoplada a seringa. Posteriormente, os complexos *cumulus*-oócito (CCOs) aspirados foram selecionados de acordo com a homogeneidade do citoplasma e presença de mais de três camadas de células do *cumulus* e distribuídos, de forma aleatória, aos sistemas de incubação já descritos. Os CCOs foram submetidos à MIV por 22h em meio TCM-199 suplementado. Após a MIV, alguns CCOs foram selecionados, aleatoriamente, para marcação com Hoechst 33342 e posterior avaliação da taxa de maturação. As demais estruturas foram submetidas à FIV com sêmen de touro de fertilidade comprovada. Para isso, palhetas de sêmen congeladas foram devidamente descongeladas e preparadas para o procedimento. A partir disso, foram feitas gotas do sêmen processado, nas quais foram depositados os CCOs para a FIV, a qual ocorreu em meio Brackett-Oliphant (BO) por 6h. Posteriormente, os presumíveis zigotos

\*Endereço para correspondência:

[alves.mirelly.96@gmail.com](mailto:alves.mirelly.96@gmail.com)

foram submetidos ao vórtex, para remoção das células do cumulus, lavados e submetidos ao CIV em meio SOF. O desenvolvimento no decorrer do CIV foi acompanhado por oito dias pós-FIV. No dia 2, foi avaliada a taxa de clivagem (clivados/total em cultivo), enquanto nos dias 7 e 8 foi avaliada a taxa de blastocistos (blastocistos/total em cultivo). Além disso, ao dia 8, também foi avaliada a qualidade dos blastocistos produzidos, determinado pelo número de blastômeros por blastocisto.

As taxas de MIV e CIV (taxas de clivagem, produção de blastocistos e blastocistos eclodidos) foram avaliadas pelo teste exato de Fisher. A qualidade dos blastocistos produzidos foi avaliada a partir do número total de células por blastocisto e analisada através de análise de variância (one-way ANOVA) usando o pacote estatístico GraphPad InStat 7.0. Para todos os testes, valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No que se refere à taxa de maturação, foram utilizados 142 oócitos. Oócitos em metáfase I foram observados em 12,3% (10/81) e 14,8% (9/61) para os grupos CONV e MINI respectivamente. A maioria dos oócitos alcançou o estágio metáfase II, com 70,4% (CONV) e 50,8% (MINI), sem diferenças entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Quanto avaliação realizada após a FIV, um total de 1360 presumíveis zigotos foram cultivados nos diferentes sistemas de incubação (Tab. 1). O número de células por blastocisto expandido foi verificado e não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os dois grupos experimentais:  $122,2 \pm 29,1$  (CONV) e  $145,9 \pm 57,1$  (MINI).

**Tabela 1:** Produção *in vitro* de embriões bovinos em sistema convencional (CONV) e mini incubadora (MINI).

Grupos	Presumíveis zigotos (n)	Taxa de clivagem (%)	Taxa de blastocistos (%)		Taxa de eclosão (%)
			D7		
			D7	D8	
CONV	731	$74,0 \pm 11,2^a$	$33,3 \pm 11,5^a$	$34,3 \pm 10,5^a$	$29,8 \pm 18,1^a$
MINI	629	$65,0 \pm 16,2^a$	$32,3 \pm 13,7^a$	$32,9 \pm 13,9^a$	$59,9 \pm 22,4^b$

Diferentes letras sobscritas na mesma coluna denotam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

No cultivo de embriões, o elevado volume em incubadoras convencionais foi adaptado com umidificação para minimizar tanto as mudanças devido à evaporação quanto à osmolaridade dos meios de cultivo. Por outro lado, existe atualmente uma tendência mundial em laboratórios de reprodução assistida em humanos para usar mini-incubadoras, nas quais a tensão final de CO<sub>2</sub> não é regulada pela incubadora, mas pré-misturada no cilindro da empresa fornecedora de gás. Nestes equipamentos, o pequeno volume da câmara permite uma rápida recuperação das condições iniciais de cultivo e, conseqüentemente, uma economia na mistura gasosa (LEE *et al.*, 2013).

Em nosso estudo, os sistemas experimentais testados (CONV e MINI) apresentaram a mesma eficiência para as diferentes etapas da PIVE, ou seja, MIV, FIV e CIV. Os efeitos da tensão de oxigênio *in vitro* sobre o desenvolvimento embrionário ainda são controversos.

\*Endereço para correspondência:

[alves.mirelly.96@gmail.com](mailto:alves.mirelly.96@gmail.com)

Embora a concentração de oxigênio no oviduto dos mamíferos varie entre 2% e 9% (FISCHER e BAVISTER, 1993), vários estudos encontram sucesso no cultivo a 20% (THOMPSON *et al.*, 1990; MINGOTI *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

### CONCLUSÕES

Sob nossas condições experimentais, ambos os sistemas testados demonstraram ser eficientes para obtenção *in vitro* de embriões bovinos, podendo ser utilizados indistintamente na prática laboratorial.

### REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Estatísticas. Disponível em <[www.agricultura.gov.br/acessoainformacao/estatistica](http://www.agricultura.gov.br/acessoainformacao/estatistica)>. Acesso em 13 fevereiro 2017.

FISCHER, B.; BAVISTER, B.D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.99, p.673-679, 1993.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. Roca, São Paulo, 2008.

IETS. The International Embryo Transfer Society. 2013 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Disponível em <[www.iets.org/pdf/comm\\_data/December2014.pdf](http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2014.pdf)>.

Acesso em 29 janeiro 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, 2003.

LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A.C.O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, v.65, p.137-152, 2006.

MINGOTI, G.Z.; CASTRO, V.S.D.C.; MÉO, S.C.; BARRETTO, L.S.S.; GARCIA, J.M. The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine *in vitro* procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, v.47, p.361-367, 2011.

OLIVEIRA, C.S.; SARAIVA, N.Z.; CRUZ, M.H.; MAZETI, B.; OLIVEIRA, L.Z.; LOPES, F.L.; GARCIA, J.M. HDAC inhibition decreases XIST expression on female IVP bovine blastocysts. *Reproduction*, v.145, p.9-17, 2013.

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*, v.68, p.236-243, 2003.

THOMPSON, J.G.E.; SIMPSON, A.C.; PUGH, P.A.; DONNELLY, P.E.; TERVIT, H.R. Effect of oxygen concentration on *in-vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.89, p.573-578, 1990.

YUAN, Y.Q.; VAN SOOM, A.; COOPMAN, F.O.J.; MINTIENS, K.; BOERJAN, M.L.; VAN ZEVEREN, A.; DE KRUIF, A.; PEELMAN, L.J. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology*, v.59, p.1585-1596, 2003.

\*Endereço para correspondência:

[alves.mirelly.96@gmail.com](mailto:alves.mirelly.96@gmail.com)