

EFEITO DO TEMPO DE MATURAÇÃO OVOCITÁRIA SOBRE A TAXA DE DESENVOLVIMENTO, A PROPORÇÃO SEXUAL E A CRIOTOLERÂNCIA DOS EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Pegoraro, L.M.C.¹; Rheingantz, M.G.T.²; Silva, P.S.³; Santos, B.³; Anghinoni, L.B.¹; Dode, M.⁴

¹Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado. Br 392 km 78 CP 403 Pelotas 96001-970 RS (ligia@cpect.embrapa.br); ²Prof. Adjunto do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas UFPel. ³Estagiárias do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Clima Temperado. ⁴Embrapa Centro de Recursos Genéticos e Biotecnologia.

O objetivo do experimento foi avaliar o efeito de diferentes tempos de maturação ovocitária (18 e 24 horas) sobre a taxa de desenvolvimento embrionário, a proporção sexual e a criotolerância dos embriões bovinos produzidos *in vitro*. Ovários de bovinos foram coletados em abatedouros e transportados em solução fisiológica adicionada de antibióticos até o laboratório. Foram puncionados os folículos de 2-8 mm com auxílio de agulha 18 G e seringa. A maturação dos ovócitos de grau I e II foi realizada em meio TCM 199 adicionado de FSH/LH e antibióticos a 39°C e 5% de CO₂ durante o período de 18 horas (G1) ou 24 horas (G2). O método de seleção dos espermatozoides utilizado foi o Gradiente de Percoll (90 e 45%) e o meio de fecundação utilizado foi o meio FERT-TALP. Decorridas 18-24h da fecundação, os zigotos foram transferidos para o cultivo em gotas de 200 µl de meio SOFaa, sob óleo mineral, em estufa a 39°C e 5% de CO₂. No oitavo dia após a fecundação, foram comparados os índices de desenvolvimento embrionário nos dois grupos (% blastocistos de grau I e II/clivados). Os blastocistos de qualidade I e II foram destinados à sexagem pelo método de PCR (G1 n=179; G2 n=159). Para a sexagem, os embriões foram agrupados segundo a velocidade de desenvolvimento em lentos (blastocistos iniciais - Bi e blastocistos -Bl, G1 n=42; G2 n=37), intermediários (blastocistos expandidos - Bx; G1 n=101; G2 n=104) e rápidos (blastocistos em eclosão - Bh e blastocistos eclodidos - Be; G1 n=36; G2 n=18). A criopreservação dos blastocistos produzidos (G1 n=15; G2 n=20) foi efetuada pela vitrificação segundo a metodologia descrita por Vajta (Mol. Reprod. Dev., 51, p. 53-58, 1998). A viabilidade embrionária após descongelação foi avaliada mediante desenvolvimento durante cultivo *in vitro* por 24 (re-expansão) e 48 horas (eclosão). A análise estatística do experimento, quanto ao desenvolvimento embrionário, sobrevivência após descongelação, proporção macho:fêmea entre os tratamentos e de cada tratamento com a teoricamente esperada de 1:1, foi realizada pelo teste do χ^2 . Não houve diferença quanto ao desenvolvimento embrionário (G1 42,8% vs G2 42,2%) e quanto à sobrevivência após descongelação durante cultivo *in vitro* (G1 65% vs G2 75%; G1, 46,6% vs G2 45,5%; respectivamente para 24 e 48 horas de cultivo). Houve diferença entre os tratamentos somente quando foram analisados os embriões de desenvolvimento rápido (50% versus 83,3% de machos no grupo 18 e 24 h respectivamente, P<0,05). Não foram detectadas diferenças entre os grupos de desenvolvimento lento e intermediário, assim como entre a proporção total de machos de cada tratamento e a teoricamente esperada. A redução do tempo de maturação para 18 horas pode ser incorporada à rotina do processo de produção *in vitro* de embriões bovinos sem alterações dos índices de desenvolvimento, criotolerância e proporção de machos obtida.

EFFECT OF OOCYTES MATURATION CULTURE TIME TO DEVELOPMENT RATES, SEX RATIO AND FREEZABILITY OF BOVINE EMBRYOS PRODUCED *IN VITRO*

The objective of this study was to evaluate the effect different maturation culture time (18 and 24 hours) to development rates, sex ratio and freezability of bovine embryos produced *in vitro*. Ovaries were collected from cows at a local abattoir and brought to laboratory in physiological saline solution with antibiotics. The oocytes were aspirated from 2-8 mm follicle with an 18 gauge needle and syringe. The maturation culture of oocytes graded as I and II was performed in different time (G1 18 h and G2 24 h) in TCM 199 medium added with FHLH and antibiotics at 39°C in a atmosphere of 5% CO₂. The sperm preparation method used was the Percoll density gradient (90 and 45%) and *in vitro* fertilization medium used was FERT-TALP. After fertilization period, the zygotes were transferred to culture dish containing 200 µl micro droplets SOFaa medium under a layer of mineral oil at 39°C in a atmosphere of 5% CO₂. The development rate (% blastocyst I and II/cleaved) was compared among treatments at eight day after fertilization. At the same day of culture, blastocyst graded as I and II were harvested and the sex was examined by PCR reaction (G1 n=179; G2 n=159). According to their developmental stages, they were distributed in three groups: Slow (initial Blastocyst, Bi; Blastocyst, Bl; G1 n=42; G2 n=37), Intermediate (expanding blastocyst, Bx; G1 n=101; G2 n=104) and Fast (hatched, Bh and hatching blastocyst, Be; G1 n=36; G2 n=18). Cryopreservation (G1 n=15; G2; n=20) was performed by vitrification following methodology described by Vajta (Mol. Reprod. Dev., 51, p. 53-58, 1998). Embryo survival after vitrification was evaluated by *in vitro* culture during 24 (re-expansion) and 48 hours (eclosion). A χ^2 analysis was performed to compare development rates, survival after vitrification, sex ratios among different maturation time and each treatment from an expected ratio of 50:50. There was no difference between development rates (G1 42.8% vs G2 42.2%) and survival rates after vitrification during *in vitro* culture (G1 65% vs G2 75% at 24 h; G1, 46,6% vs G2 45,5%; at 48 h *in vitro* culture). There was difference between treatments only in the fast group (50% vs 83,3% of males in G1 and G2, respectively P<0.05). There was no difference among slow and intermediate group, as well as total male proportion in each treatment and 50% expected sex ratio. The maturation time of 18 h may be incorporated in IVP bovine system without damage to development rates, freezability and sex ratio.