

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM FONTES PROTÉICAS DEFINIDAS E INDEFINIDAS
(*In vitro* production of bovine embryos in medium supplemented with defined and undefined protein sources)

MOZZAQUATRO, F.D.^{1,4}; RUBIN, M.I.B.⁴; SILVA, C.A.M.⁴; TESSMANN, J.V.^{1,4};
RAUBER, L.P.^{1,4}; KURTZ FILHO, M.³; SCHERER, D.^{1,4}; BUNN, S.^{2,4}

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

²Acadêmico de iniciação Científica, Embryolab;

³Departamento de Morfologia, CCS, UFSM, Santa Maria, RS;

⁴Embryolab.

RESUMO – Quinhentos e trinta e três (n=533) complexos cumulus-oócitos (CCO) bovinos foram utilizados para comparar a suplementação dos meios de maturação e cultivo com diferentes fontes protéicas: soro de égua em estro (SEE; n=150) e soro de vaca em estro (SVE; n=123), álcool polivinílico (PVA; n=128) e albumina sérica bovina (BSA; n=132). Os grupos de CCO foram distribuídos aleatoriamente e maturados *in vitro* por 24h em TCM-199 com 10% de SEE, 10% SVE, 0,1% PVA e 0,6% BSA em estufa de cultivo com 5% de CO₂, a 39°C e umidade saturada. A fecundação foi realizada durante 18h, em meio FERT-TALP em estufa de cultivo. Os embriões foram cultivados por 8 dias em meio synthetic oviduct fluid (SOFaaci) com 5% SEE, 5% SVE, 0,1% PVA e 0,6% BSA em estufa de cultivo a 39°C, sendo mantidos em bolsas gaseificadas com 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂. A produção de embriões no D7 nos tratamentos SEE (33/142; 23%) e SVE (34/103; 33%) foi superior (P<0,05) a dos tratamentos PVA (6/116; 5%) e BSA (4/126; 3%). No D9, a taxa de blastocistos nos tratamentos SEE (22/142; 15%) e SVE (22/103; 21%) foram superiores (P<0,05) a do grupo BSA (3/126; 2%). A produção de blastocistos foi superior quando se adicionou soro ao meio de cultivo. Confirmou-se neste estudo que o SEE é uma alternativa para a PIV por três importantes razões: as taxas de produção embrionária obtidas, a facilidade de processamento e a redução da possibilidade de transmissão de doenças espécie-específicas.

Palavras chaves: soro de égua, bovino, PIV, PVA, BSA.

ABSTRACT – Five hundred and thirty three (n=533) bovine cumulus-oocytes complexes (COC) obtained by aspiration of 2-8mm diameter follicles were used to compare maturation and culture media containing distinct protein sources: estrus mare serum (EMS; n=150), estrus cow serum (ECS=123), polyvinyl alcohol (PVA; n= 128) and bovine serum albumin (BSA; n=132). COC groups were randomly distributed into treatments and *in vitro* matured (IVM) in TCM-199 + 10% EMS, 10% ECS, 0.1% PVA and 0.6% BSA for 24h using an incubator with 5% CO₂ at 39°C and saturated air humidity. Fertilization was accomplished during 18h in FERT-TALP medium at the same temperature and gas atmosphere of the previous maturation phase. Denudation was performed and the zygotes were cultured for 8 days in synthetic oviduct fluid (SOFaaci) medium + 5% EMS, 5% ECS, 0.1% PVA and 0.6% BSA in an incubator at 39°C using gasified bags with 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂. Embryo production in D7 for treatments EMS (33/142; 23%) and ECS (34/103; 33%) were higher (P<0,05) than PVA (6/116; 5%) and BSA (4/126; 3%). On day 9 blastocysts development rates in EMS (22/142; 15%) and ECS (22/103; 21%) treatments were higher (P<0.05) than in BSA (3/126; 2%). Blastocyst production was higher with the addition of serum to the medium. It was confirmed that EMS is an alternative for *in vitro* production (IVP) for three important reasons: the embryo production rates obtained, the easiness of the process and the reduction of the possibility of specific species disease transmission.

Key words: mare serum, bovine, IVP, PVA, BSA.

Introdução

A produção *in vitro* (PIV) na espécie bovina tem sido aplicada na pesquisa, não somente para estudar os mecanismos básicos envolvidos na reprodução animal, como também, na melhoria dos meios de cultivo para incrementar os índices de produção de embriões.

Os sistemas de meios utilizados para a PIV são comumente classificados como definidos, semi-definidos e indefinidos. Os meios definidos são livres de soro ou outro material biológico. Os meios indefinidos são aqueles cuja composição incluem alguma substância de origem biológica (GORDON, 1994). Os embriões bovinos podem ser cultivados em meios com condições definidas, mas a suplementação com proteína de origem animal tem se mostrado benéfica para o desenvolvimento dos embriões (GOMEZ e DIEZ, 2000; FIGUEIRÓ *et al.*, 2000a).

Embriões cultivados na ausência de proteínas de origem animal possuem diferenças na sua atividade metabólica, diminuição na capacidade de desenvolvimento e no número de células quando comparados àqueles cultivados na presença destas proteínas (GOMEZ e DIEZ, 2000).

Muitos estudos têm sido desenvolvidos em busca de protocolos definidos, para identificar a composição exata dos meios com o objetivo de se evitar a grande variabilidade nos resultados atribuída, principalmente, às fontes protéicas de origem animal. Porém estes protocolos ainda não viabilizaram a obtenção de taxas embrionárias superiores aos protocolos que preconizam fontes protéicas animais (MARQUANT-LEGUIENE e HUMBLLOT, 1998; HOLM *et al.*, 1999).

O soro é um componente de origem biológica utilizado em inúmeros protocolos de PIV, fornecendo nutrientes e fatores ainda pouco conhecidos. No entanto, há sempre o risco da introdução de agentes patogênicos (ROSSI *et al.*, 1980; STRINGFELLOW *et al.*, 2000) nas diferentes etapas do processo. Mesmo com o aperfeiçoamento dos métodos

de coleta e processamento do soro, que possibilitaram a eliminação de contaminantes exógenos certas viroses podem permanecer e os métodos de inativação pelo calor ou radiação gama não são inteiramente eficazes na eliminação da contaminação vírica (PALASZ e DEL CAMPO, 1995).

O uso de soro heterólogo, como o de égua, na PIV de embriões bovinos é uma alternativa para evitar a transmissão de doenças espécie-específicas que podem ser carregadas pelos diferentes materiais de origem animal, fontes potenciais de patógenos (FIGUEIRÓ *et al.*, 2000a). A adição de soro eqüino na PIV de embriões bovinos baseia-se nos estudos de MEZZALIRA *et al.* (1990) com embriões de camundongos em estágios iniciais, cultivados em meio com soro eqüino. A viabilidade e a aplicabilidade do soro de égua em estro na PIV de embriões bovinos foi estudada por FIGUEIRÓ *et al.* (2000a), ao identificarem melhores resultados com o soro de égua no primeiro dia do cio comparado com o uso do soro de vaca em estro. Comparou-se aqui a suplementação dos meios de maturação e cultivo com distintas fontes protéicas: soro de égua em estro (SEE), soro de vaca em estro (SVE), álcool polivinílico (PVA) como surfactante e albumina sérica bovina (BSA).

Material e Método

Obtenção do soro: O soro de égua para PIV de embriões bovinos foi obtido de fêmeas com sanidade comprovada no primeiro dia do estro, sendo processado de acordo com o protocolo descrito por FIGUEIRÓ *et al.* (2000a).

Coleta dos ovários, identificação e seleção dos complexos cumulus-oócitos (CCO)

Os ovários foram obtidos de vacas abatidas em frigorífico, sendo transportados à temperatura de 30°C em solução fisiológica de NaCl^a a 0,9% acrescida de 100mg/mL de estreptomicina^a e 50UI/mL de penicilina G-Potássica^a, em tempo não superior a 2h após o abate. Os folículos com diâmetro entre 2 a 8mm foram punccionados com auxílio de uma bomba de vácuo^b (11mL/min) e os Complexos cumulus-oócitos foram mantidos em líquido

folicular para a identificação sob lupa estereomicroscópica^c. Todos os CCO foram imediatamente selecionados de acordo com o aspecto morfológico conforme o critério de avaliação descrito por DELOSS *et al.* (1989).

Maturação *in vitro*: Os CCO foram distribuídos aleatoriamente em 4 tratamentos com 20 a 30 unidades cada, para maturação *in vitro* (MIV) em TCM-199^d acrescido de 5,95mg/mL de HEPES (H6147)^a, 0,025mg/mL de piruvato de sódio^a, 2,2 mg/mL de NaHCO₃^a, 0,01UI de hormônio folículo estimulante recombinante humano (rFSH-h/mL)^e, 0,5mg/mL de hormônio luteinizante bovino (LHb)^f. Para cada tratamento adicionou-se ao meio as diferentes fontes protéicas. O grupo de CCO tratados com álcool polivinílico foi acrescido 0,1% de PVA^a, o tratamento albumina sérica bovina foi acrescido de 0,6% de BSA^a, e nos tratamentos com soro de égua em estro (SEE) e soro de vaca em estro (SVE), acrescentou-se 10% de soro de égua e de vaca em estro, respectivamente. Os CCO permaneceram por 24h em estufa^g de cultivo à temperatura de 39°C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

Fecundação *in vitro* (FIV): Concluída a maturação, os CCO foram transferidos para placas de quatro poços^h com meio TALP-FERT (PARRISH *et al.*, 1986) acrescido de 6mg/mL de BSA, 0,022mg/mL de piruvato de sódio, PHE e 30mg/mL de heparina^a. Para a fecundação utilizou-se sêmen congelado de um touro *Bos taurus* testado para PIV. O sêmen foi preparado pela técnica de migração ascendente (*swim-up*), em meio TALP-SPERM, acrescido de 6mg/mL de BSA e 0,11mg/mL de piruvato de sódio. A dose

inseminante foi de 1x10⁶ espermatozoides/mL e os CCO/espermatozoides de todos os tratamentos permaneceram a 39°C, em estufa de cultivo, com 5% de CO₂ em ar com umidade saturada, por 18h.

Cultivo *in vitro* de embriões: Concluído o período de fecundação, os prováveis zigotos foram submetidos à agitação mecânica em TCM-HEPES acrescido de 0,1% de PVA. Logo após, os mesmos foram lavados e transferidos para gotas de 400mL do meio SOFaaci – *Synthetic Oviduct Fluid* (HOLM *et al.*, 1999), acrescido de PVA: 0,1% de álcool polivinílico; BSA: 0,6% de albumina sérica bovina; SEE: 5% de soro de égua em estro ou SVE: 5% de soro de vaca em estro conforme o tratamento, em placas de cultivo de 4 poços, sob óleo mineral^a. As placas foram acondicionadas em bolsas gaseificadas com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ em estufa de cultivo à temperatura de 39°C, por 8 dias.

A avaliação do índice de clivagem foi efetuada 48h após a fecundação (D2). No dia sete (D7) avaliou-se o índice de blastocistos iniciais (Bi), blastocistos (Bl), blastocistos expandidos (Bx) e eclodidos (Be). No dia 9 (D9), determinou-se o percentual de blastocistos expandidos/eclodidos.

Delineamento Experimental e Análise Estatística

O delineamento experimental foi de blocos inteiramente casualizados. Os diferentes tratamentos foram realizados simultaneamente, sendo que cada uma das cinco repetições foi considerada um bloco. Os resultados foram processados pelo

FONTES DE AQUISIÇÃO

a – Sigma Chemical CO. – P.O. Box 4508, MO., USA.

b – Nevoni Equipamento Odonto Médico Hospitalar Ltda – Rua Dom João V, 266/280 Lapa 05.075-060 São Paulo, SP, Brasil.

c – Carl Zeiss – 73446 Oberkochen, Alemanha.

d – Gibco BRL, Grand Island, N.Y. 14072, USA.

e – Serono Pharma S.p.A. – 70123, Bari, Itália (L1930300).

f – Lutropin - Vetrepharm, Canadá.

g – W.C. Heraeus GmbH. Postfach 1553 D-6450 Hanau 1, Alemanha

h – Nunclon, Nunc Brand Products – Postbox 280, DK-4000, Roskilde, Dinamarca.

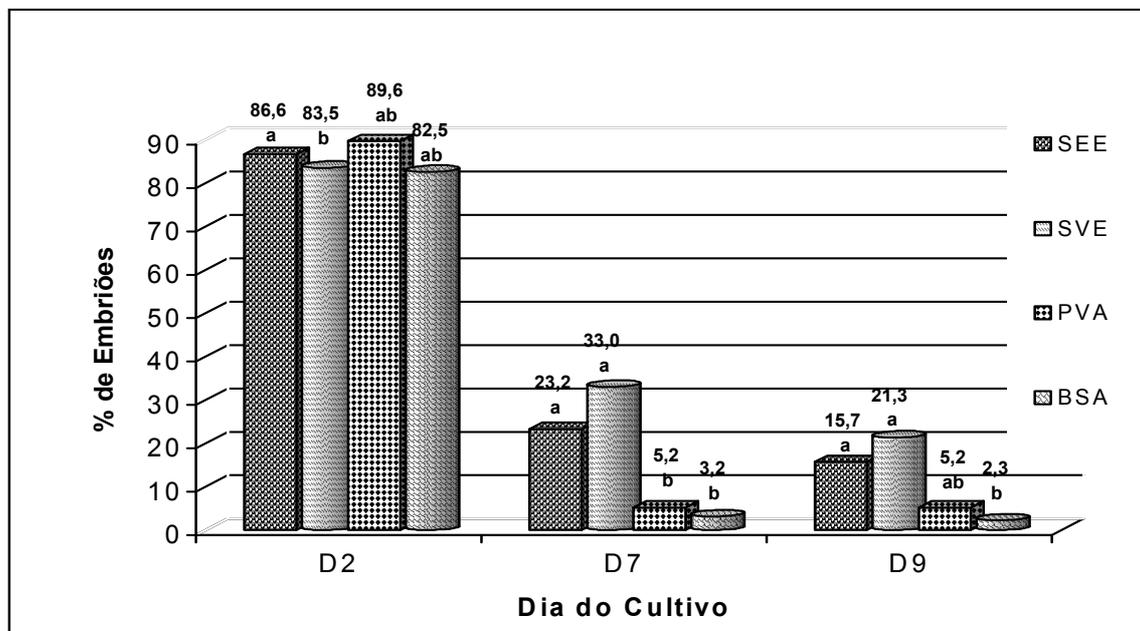
programa estatístico SAS utilizando o procedimento GLM (SAS, 1998) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Resultado e Discussão

Vários pesquisadores demonstraram que é possível produzir embriões *in vitro* em sistemas de cultivo sem a adição de fontes protéicas de origem animal (ECKERT e NIEMANN, 1995; HOLM *et al.*, 1999). Porém, na fecundação, as proteínas parecem ter um papel importante na antecipação da formação

dos pró-núcleos (ECKERT e NIEMANN, 1995). Os autores verificaram queda significativa nas taxas de clivagem e, posteriormente, de blastocistos, quando submeteram os CCO ao processo de FIV sem fonte protéica. Ainda há muito a esclarecer, pois não se obteve sucesso na PIV de embriões bovinos em um sistema totalmente livre de proteínas nas três etapas da produção: maturação, fecundação e cultivo. Embora o ideal seja cultivar embriões em condições definidas, livres de agentes exógenos, estes meios ainda são pouco aplicados na PIV comercial.

FIGURA 1 – PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS COM COMPLEXOS CUMULUS-OÓCITOS (CCO) BOVINOS TRATADOS COM FONTES PROTÉICAS DEFINIDAS E INDEFINIDAS.



a,b Letras diferentes nas colunas diferem significativamente ($P < 0,05$).

A PIV de embriões bovinos para fins comerciais necessita que os sistemas de cultivo e seus componentes sejam livres de doenças específicas e garantam altas taxas de desenvolvimento embrionário com repetidos resultados (HOLM *et al.*, 1999).

O soro é um material de origem biológica que possui nutrientes e fatores ainda pouco conhecidos tendo um importante papel no processo de maturação dos oócitos e cultivo dos embriões. No entanto, por ser de origem biológica, há o risco da introdução de agentes patogênicos. No presente estudo, os

resultados referentes ao percentual de zigotos, blastocistos no D7 e blastocistos no D9 do cultivo dos diferentes tratamentos estão descritos na FIGURA 1. Na avaliação da clivagem em D2, verificou-se diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos suplementados com soro de égua e soro de vaca em estro. Os CCO maturados e cultivados em SEE (fonte protéica heteróloga) e SVE (fonte protéica homóloga) apresentaram maior número de blastocistos ($P < 0,05$) em D7 quando comparados com os tratamentos com PVA (substância definida) e BSA (fonte semi-

definida). No dia 9 os grupos de embriões cultivados com SEE e SVE apresentaram número de blastocistos superior ($P < 0,05$) ao grupo cultivado com BSA. Os resultados indicam que a PIV de embriões bovinos foi superior ($P < 0,05$), quando os CCO/embriões foram cultivados na presença de fonte protéica de origem animal.

A taxa média de embriões em D7 tanto para o grupo de CCO maturados e cultivados no SVE (33%; 34/103), bem como aqueles maturados e cultivados em SEE (23%; 33/142), não diferiram dos dados observados na literatura (FIGUEIRÓ *et al.*, 2000a; BRUM, 2000; KURTZ, 2002; ALVES, 2002 e RAUBER, 2002). Por suas taxas de blastocistos nos tratamentos PVA (5%; 6/116) e BSA (3%; 4/126) foram inferiores às relatadas por HOLM *et al.* (1999) e ECKERT e NIEMANN (1995). Por outro lado, não se verificou diferença ($P > 0,05$) entre os índices de blastocistos nos tratamentos SEE (16%; 22/123), SVE (21%; 22/103) e PVA (5%; 6/116) no D9 do cultivo quando comparados ao tratamento com BSA (2%; 3/126).

Embora as médias dos índices de produção de blastocistos tenham sido similares quando se utilizou o soro, os valores obtidos para os meios definidos foram inferiores aos relatados na literatura. Protocolos com meios definidos para a maturação de CCO e cultivo de embriões bovinos, ainda necessitam ser estudados principalmente para uso nos programas comerciais de PIV.

Fundamentado nos estudos desenvolvidos por FIGUEIRÓ *et al.* (2000a,b), o grupo de pesquisa do Embryolab já incorporou o soro de égua em estro ao protocolo de PIV pelo aspecto sanitário e pela facilidade de obtenção/processamento. A utilização de um soro heterólogo pode ser uma importante alternativa para a OPU/PIV comercial de embriões bovinos.

Conclusões

A produção *in vitro* de blastocistos bovinos foi superior com o uso de meios indefinidos na maturação e cultivo *in vitro*. O soro de égua em estro na maturação e cultivo

resultou em taxas de blastocistos em D7 e D9 similares às obtidas com o uso de soro de vaca em estro além de ser uma fonte protéica alternativa de fácil aquisição e de baixo custo para processamento e uso na pesquisa com embriões bovinos e na OPU/PIV comercial.

Referências

- ALVES, D.F. **Transporte e maturação *in vitro* de oócitos bovinos**. Santa Maria, 2003. 47p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.
- BRUM, D.S. **Transporte cultivo dos embriões bovinos produzidos *in vitro***. Santa Maria, 2000. 63p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria.
- DELOSS, F.; VANVLIET, C.; VANMAURIK, P.; KRUIP, Th. A.M. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, New York, v.24, n.2, p.197-204, 1989.
- ECKERT, J.; NIEMANN, H. *In vitro* maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. **Theriogenology**, New York, v.43, n.7, p.1211-1225, 1995.
- FIGUEIRÓ, G.M.; BRUM, D.S.; MEZZALIRA, A.; FIALHO, S.S.; ALVES, M.R.L.; RUBIN, M.I.B.; SILVA, C.A.M. O soro equino na PIV de embriões bovinos. I. Análise do soro de égua em diferentes estágios do cio. **Arquivos da Faculdade Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v.28, n.1, p.258, 2000a. Suplemento.
- FIGUEIRÓ, G.M.; MEZZALIRA, A.; RAUBER, L.P.; LEIVAS, F.G.; ALMEIDA, N.V.; RUBIN, M.I.B.; SILVA, C.A.M. O soro equino na PIV de embriões bovinos: II. Uma análise da adição de FSH e LH. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v.28, n.1, p.259, 2000b. Suplemento.
- GOMEZ, E.; DIEZ, C. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.58, n. 1-2, p.23-37, 2000.
- GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryo**. CAB International, University Press, Cambridge, 640p, 1994.

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.

KURTZ, M.F. **Maturação e fecundação de oócitos bovinos mantidos em banho-maria**. 2003. 67f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

MARQUANT-LEGUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Practical measures to improve *in vitro* blastocyst production in the bovine. **Theriogenology**, New York, v.49, n.1, p.3-11, 1998.

MEZZALIRA, A.; BARICHELLO, E.M.M.R.; RUBIN, M.I.B. Cultivo de embriões *Mus musculus* com soro eqüino. In: V REUNIÃO ANUAL DA SBTE, 1990, **Anais...**, Curitiba – PR, p.83-84, 1990.

PALASZ, A.T.; DEL CAMPO, M. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Recent advances. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES – BIOTECNOLOGIA Y TECNOLOGIA AVANZADAS, 1995. **Anais...**, Montevideo – Uruguay, p.78-85, 1995.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.; 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.

RAUBER, L.P. **Líquido folicular bovino na produção in vitro de embriões bovinos**. 2003. 46f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

ROSSI, C.R.; BRIDGMAN, B.S.; KIESEL, G.K. Viral contamination of bovine fetal lung cultures and bovine fetal serum. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v.41, n.10, p.1680-1681, 1980.

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

STRINGFELLOW, D.A.; RIDDELL, K.P.; GALIK, P.K.; DAMIANI, P.; BISHOP, M.D.; WRIGHT, J.C. Quality controls for bovine viral diarrhea virus-free IVF embryos. **Theriogenology**, New York, v.53, n.3, p.827-839, 2000.

Recebido para publicação: 20/01/2004
Aprovado: 25/05/2004