

EFEITOS DA SUBSTITUIÇÃO DO SORO FETAL BOVINO (SFB) E DA ALBUMINA SÉRICA BOVINA (BSA) PELA OVALBUMINA (OVA) NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Tetzner, T.A.D.¹; Saraiva, N.Z.¹; Perecin, F.¹; Ferreira, C.R.²; Méo, S.C.³; Oliveira, C.S.¹; Melo, D.S.¹; Monteiro, F.M.¹; Vantini, R.¹; Garcia, J.M.¹

¹DMVPR-FCAV-UNESP, Jaboticabal-SP, Brasil, ²ZAB-FZEA-USP, Pirassununga-SP, Brasil, ³CPPSE-EMBRAPA, São Carlos-SP, Brasil. tatiane_tetzner@yahoo.com.br

As biotecnologias aplicadas à reprodução animal vêm causando grandes impactos à produção animal, principalmente nas últimas duas décadas. Historicamente, o meio de cultivo contém SFB ou BSA, que são preparados e purificados a partir de produtos derivados sanguíneos e apresentam altos riscos de contaminação por patógenos, como vírus: BHV-1 e BVDV (GUERIN et al., Bull Academic Veterinarian France, v.61, p.513-520, 1988), e príons: BSE (KRISHER et al., Biology of Reproduction, v.60, p.1345-1352, 1999). De acordo com Barlian et al. (Cell Biology International, v.17, p.677-684, 1993), a OVA é um suplemento protéico não aparentado ao BSA, mas que possui a capacidade de manter a proliferação celular. Além disso, por ser de origem heteróloga, os riscos de transmissão de doenças são menores. O presente trabalho objetivou avaliar os efeitos da substituição do SFB e do BSA pela OVA na PIV. Os oócitos foram maturados *in vitro* (MIV) em meio TCM 199 com sais de Earle, suplementado de acordo com os tratamentos: SFB (10% SFB; Crypion®), BSA (Inlab®; 4mg/mL BSA), OVA (Inlab®; 4mg/mL OVA), e 1,0µg/mL de FSH (Pluset®, Calier), 50µg/mL de hCG (Profasi®, Serono), 1,0µg/mL de estradiol (Sigma E-2758), 0,2mM de piruvato de sódio e 83,4µg/mL de amicacina, durante 24h à 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar. A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada após 24h de MIV, em meio TALP-FIV, com 0,2mM de piruvato, 83,4µg/mL de amicacina e suplementado de acordo com os tratamentos: 6mg/mL de BSA ou 6mg/mL de OVA. Após o término da incubação com os espermatozoides, os prováveis zigotos foram submetidos ao cultivo em meio SOF e suplementado de acordo com os tratamentos (SFB, BSA ou OVA), atmosfera com baixa tensão de O₂ (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂), umidade saturada, em câmara modular e mantida em incubadora de cultivo à 38,5°C, durante 7 a 8 dias, para atingirem o estágio de blastocisto. Os tratamentos foram nomeados da seguinte maneira: a primeira letra referente à etapa de maturação, a segunda à fecundação, e a terceira ao cultivo. Para avaliação quantitativa, foram utilizados 2355 oócitos bovinos distribuídos entre sete grupos experimentais: CONT, SBS, SOS, BBB, BOB, OOO ou OBO, em cinco repetições. No total dos oócitos avaliados, 1795 (76,22%) clivaram, 646 (27,43% do total de oócitos) tornaram-se blastocistos e 243 (10,32% do total de oócitos, ou 37,62% do total de blastocistos) eclodiram. A etapa de CIV permitiu avaliar que os diferentes tratamentos foram semelhantes (p>0,05) quanto à taxa de clivagem. Entretanto, quanto à taxa de produção de blastocistos, o grupo OOO (26,0%) foi semelhante (p>0,05) aos grupos SOS (33,8%), BBB (35,8%), BOB (32%) e OBO (33%), mas foi inferior (p<0,05) aos grupos CONT (45%) e SBS (42,8%). Quanto à taxa de eclosão, o grupo OOO (20,4%), foi inferior (p<0,05) aos grupos CONT (46,2%), SBS (43,4%), SOS (38,4%), BBB (41,6%), e semelhante aos grupos BOB (28,2%) e OBO (25,4%). Apesar da redução na quantidade blastocistos produzidos, concluímos que é possível produzir *in vitro* embriões bovinos na ausência de SFB e/ou BSA. Apoio financeiro: FAPESP 04/12248-8 e CNPq.

EFFECTS OF FETAL BOVINE SERUM (FBS) AND BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA) SUBSTITUTION FOR OVALBUMIN (OVA) ON *IN VITRO* PRODUCTION OF BOVINE EMBRYOS

The applied biotechnologies to the animal reproduction are causing great impacts on animal production, mainly in the last two decades. Historically, the culture media contain FBS or BSA, which are prepared and purified from blood products and present high risks of pathogen contamination, as virus: BHV-1 and BVDV (GUERIN et al., Bull Academic Veterinarian France, v.61, p.513-520, 1988), and príons: BSE (KRISHER et al., Biology of Reproduction, v.60, p.1345-1352, 1999). In agreement with Barlian et al. (Cell Biology International, v.17, p.677-684, 1993), the OVA is a protein supplement not related to BSA, but that possesses the capacity to maintain cellular proliferation. Besides, for being of heterologous origin it presents lower risks of disease transmission. The present work aimed to evaluate the effects of FBS and BSA substitution for OVA on IVP. The oocytes were *in vitro* matured (IVM) in TCM 199 with Earle's salts, supplemented according to the treatments: FBS (10% FBS; Crypion®), BSA (Inlab®; 4mg/mL), OVA (Inlab®; 4mg/mL), and 1.0µg/mL FSH (Pluset®, Calier), 50µg/mL hCG (Profasi®, Serono), 1.0µg/mL estradiol (Sigma E-2758), 0.2mM sodium pyruvate and 83.4µg/mL amicacin, for 24h at 38.5°C and atmosphere of 5% CO₂ in air. *In vitro* fertilization (IVF) was accomplished after 24h of IVM, in medium TALP-IVF, with 0.2mM pyruvate, 83.4µg/mL amicacin and supplemented according to the treatments: 6mg/mL BSA or 6mg/mL OVA. After the end of incubation with spermatozoa, the probable zygotes were submitted to culture in SOF supplemented according to the treatments (FBS, BSA, or OVA), atmosphere with low O₂ tension (5% O₂, 5% CO₂, and 90% N₂) in a modular camera, with saturated humidity, inside a incubator at 38.5°C, for 7 to 8 days until they reach the blastocyst stage. Each treatment was named using the first letter to design the treatment used at IVM, the second at IVF, and the third at culture. For quantitative evaluation, 2355 bovine oocytes were distributed among seven experimental groups: CONT, FBF, FOF, BBB, BOB, OOO, or OBO, in five replicates. Culture allowed the evaluation that the different treatments were similar (p>0.05) in cleavage rates. However, for blastocyst production rates, the treatment OOO (26.0%) was similar (p>0.05) to the FOF (33.8%), BBB (35.8%), BOB (32%), and OBO (33%) groups, but it was inferior (p<0.05) to the CONT (45%) and FBF (42.8%) groups. In relation to blastocyst hatching rates, the OOO group (20.4%) was inferior (p<0.05) to the CONT (46.2%), FBF (43.4%), FOF (38.4%), and BBB (41.6%) groups, and similar to the BOB (28.2%) and OBO (25.4%) groups. Besides producing lower blastocyst rates, we concluded that it is possible to *in vitro* produce bovine embryos in the absence of FBS and/or BSA using ovalbumin (OVA) as the protein source.