

## A utilização de sémen fresco na fertilização *in vitro* de embriões ovinos melhora a qualidade dos blastocistos na raça portuguesa Merino

Romão, R.<sup>1</sup>, Marques, C.C.<sup>2</sup>, Baptista, M.C.<sup>2</sup>, Vasques, M.I.<sup>2</sup>, Barbas, J.P.<sup>2</sup>, Horta, A.E.M.<sup>2</sup>, Bettencourt, E.<sup>1</sup>, Pereira, R.M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade de Évora, Polo da Mitra, Valverde, Évora

<sup>2</sup> Unidade de Recursos Genéticos, Reprodução e Melhoramento Animal, INRB IP, L INIA, Quinta da Fonte Boa, 2005-048 Vale de Santarém

A produção de embriões em ovinos é uma tarefa difícil, exigindo experiência e condições onerosas, principalmente na produção de embriões *in vivo*. A recolha sistemática de oócitos em animais de matadouro ou em animais vivos por ovum *pick-up*, permite a produção *in vitro* de embriões (IVP), em larga escala e menos dispendiosa, nos pequenos ruminantes. Esta possibilidade é importante não só como fonte de embriões mas também de oócitos e zigotos para fins comerciais ou de investigação, facilitando a sua disponibilidade em tecnologias emergentes tais como a clonagem ou a transgénese. Para IVP foram desenvolvidos vários protocolos de maturação, utilizando fertilização *in vitro* (IVF) com sémen fresco ou congelado. Em Portugal, a produção de embriões *in vitro* foi somente realizada com sémen congelado dada a sua disponibilidade em condições de rotina. Contudo, o sémen fresco poderá melhorar a produção de embriões frescos ou criopreservados.

Este trabalho teve como objectivo comparar a eficiência da IVP em ovinos usando diferentes protocolos de maturação de oócitos e IVF com sémen fresco ou congelado. Oócitos (n=1768) recolhidos em matadouro foram maturados em meio TCM199 com 100 µM cisteamine, 10 ng mL<sup>-1</sup> EGF, 10 µg mL<sup>-1</sup> E2 e gentamicina (mat A, n=692) ou suplementada com 10 µg mL<sup>-1</sup> FSH e 0,3 mM piruvato de sódio (mat B, n=707) a 39 °C e 5% CO<sub>2</sub> durante 22h. O sémen fresco (FS) e congelado/descongelado (TS) de carneiros de raça Merino Branco (n=3) foi lavado ou submetido a swim-up, respectivamente. Após a fertilização (18h p.i.), os presumíveis zigotos foram cultivados em meio de fluido sintético do oviducto (SOF) enriquecido com aminoácidos e BSA a 38,5 °C, em atmosfera humidificada com 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub> até ao estadio de 2-4-8 células. Após clivagem, o desenvolvimento embrionário prosseguiu até ao estadio de blastocisto em meio SOF, BSA e 10% FCS. A qualidade foi avaliada no dia 6-7, classificando-se como bons, médios e maus, baseado nos parâmetros IETS. Os dados das taxas de produção embrionária foram analisados utilizando ANOVA. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney U para avaliação da qualidade dos embriões.

Os diferentes protocolos de maturação não interferiram (p>0,05) quer com as taxas de maturação quer com as taxas de produção de embriões. A qualidade embrionária foi superior (p=0,004) na fertilização com sémen fresco (bom: FS=40,1±8,0% vs TS=32,9±5,6%; média: FS=20,1±4,7% vs TS=35,7±5,8%; má: FS=39,8±9,8% vs TS=31,4±7,6%).

Em conclusão, estes resultados preliminares mostram que o sémen fresco de carneiro pode ser facilmente utilizado para fertilização *in vitro* e melhora a qualidade dos embriões produzidos.

## [*In vitro* production of ovine embryos using fresh semen can improve blastocyst quality in Portuguese Merino breed]

Embryo production in sheep is a difficult task demanding experience and expensive facilities, particularly when dealing with *in vivo* embryo production. Easy ways to obtain ovine embryos consist of collecting oocytes at slaughterhouses or systematically pick them up from live animals, allowing a large scale and cheaper *in vitro* embryo production (IVP) for small ruminants. Those are important sources of embryos, oocytes and zygotes for commercial, laboratorial and research purposes, making easier the availability of resources for emerging techniques like cloning or transgenesis. For IVP, several oocyte maturation protocols have been developed using fertilization (IVF) either with fresh or frozen-thawed semen. In Portugal, IVP has been done through IVF using cryopreserved semen because it is easily available for routine use. However, the use of fresh semen could improve embryo production and cryopreservation results.

The aim of this work was to compare the efficiency of *in vitro* embryo production in ovine using different oocyte maturation protocols and fresh or frozen semen for IVF.

Abattoir-derived oocytes (n=1768) were matured in TCM199, 10 µM cysteamine, 10 ng mL<sup>-1</sup> EGF, 10 µg mL<sup>-1</sup> E2 and gentamicin (mat A, n=692) or plus 10 µg mL<sup>-1</sup> FSH and 0.3 mM sodium pyruvate (mat B, n=707) at 39 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 22h. Prior to fertilization, either fresh (FS) or frozen/thawed (TS) semen from Merino rams (n=3) was washed or submitted to swim-up respectively. Presumptive zygotes (18h p.i.) were cultured in synthetic oviductal fluid (SOF) enriched with aminoacids and 6 mg mL<sup>-1</sup> BSA at 38.5 °C, under 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> in an humidified atmosphere until the stage of 2-4-8 cell embryos. After assessing cleavage, embryo development proceeded until the blastocyst stage in SOF+BSA and 10% FCS. Quality was evaluated on D6-7 by scoring embryos as good, fair and bad based on IETS guidelines. Data from embryo production rates were analysed using ANOVA. Mann-Whitney U test was used for embryo quality evaluation.

Different maturation protocols did not interfere (P>0.05) either on maturation or on embryo quality or production rates. Embryo quality was higher (P=0.004) when fertilization was accomplished with fresh semen (good: FS=40.1±8.0% vs TS=32.9±5.6%; fair: FS=20.1±4.7% vs TS=35.7±5.8%; bad: FS=39.8±9.8% vs TS=31.4±7.6%).

Preliminary results show that ram fresh semen can be easily used for *in vitro* fertilization and improves the quality of produced embryos.