



UFSM

Tese de Doutorado

**INFLUÊNCIA DA ATMOSFERA GASOSA E DA FONTE
PROTÉICA SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO
IN VITRO E
TAXA DE PREENHEZ EM BOVINOS**

Fábio Gallas Leivas

PPGMV

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**INFLUÊNCIA DA ATMOSFERA GASOSA E DA FONTE
PROTÉICA SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO
IN VITRO E TAXA DE PREENHEZ EM BOVINOS**

Por

Fábio Gallas Leivas

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Antonio Mondino Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**INFLUÊNCIA DA ATMOSFERA GASOSA E DA FONTE
PROTÉICA SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO
IN VITRO E TAXA DE PREENHEZ EM BOVINOS**

elaborada por
Fábio Gallas Leivas

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dr. Carlos Antonio Mondino Silva
(Presidente/Orientador)

Dra. Deila Rozely Schossler
UFSM-Santa Maria, RS

Dr. Cláudio Alves Pimentel
UFPeI – Pelotas, RS

Dr. Marcelo Marcondes Seneda
UEL- Londrina-PR

Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin
UFSM-Santa Maria, RS

Santa Maria, 18 de maio de 2006.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me oferecer as oportunidades da vida.

Aos meus pais Neide e Francisco e aos meus irmãos Ana Flávia e Eduardo, pelo incentivo constante, confiança e convivência. Apesar da distância sempre estamos presentes e unidos, servindo de exemplo uns aos outros.

À Daniela Brum pela colaboração irrestrita, convivência e carinho durante a realização deste trabalho. Que este seja mais um passo da caminhada de nossas vidas.

Aos meus orientadores, Dr. Carlos Antonio Mondino Silva e Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin, pela orientação, profissionalismo, amizade e pela confiança depositada em nosso trabalho. À Dra. Mari Lourdes Bernardi pela amizade, dedicação e auxílio incondicional nesta pesquisa.

Aos colegas Sérgio Fialho, Fabrício Mozzaquatro, Luiz Fernando Cáceres Pilla e Sandra Elisa Pozzobon pela amizade e colaboração durante esta caminhada e aos amigos Mário Celso S. Brum, Ingborg Langohr e Maurício Diniz que estiveram presentes neste período.

Aos professores Dra. Karin Érica Brass, Dr. Flávio D. De La Corte, Dra. Dominguita L. Graça e aos estagiários da grande família Embryolab, que colaboraram no desenvolvimento deste trabalho, sempre com grande responsabilidade e dedicação.

À Universidade Federal de Santa Maria e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), instituições públicas de qualidade e de excelência na formação profissional.

Ao Cenatte Embriões e à Nova Índia Genética, cujos suportes viabilizaram a execução deste trabalho.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para o êxito dessa jornada, muito obrigado!

“Não há limites para o homem que tem a
capacidade de sonhar e a
determinação para transformar
seus sonhos em realidade.”

Autor desconhecido

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE APÊNDICES	8
RESUMO	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. CAPÍTULO 1 - Concentração de oxigênio na MIV e FIV de oócitos bovinos: Efeito sobre o desenvolvimento embrionário e taxa de prenhez	17
Introdução.....	20
Material e Métodos.....	23
Resultados.....	27
Discussão.....	29
Referências.....	35
3. CAPÍTULO 2 - Aumento da taxa de gestações com embriões <i>Bos taurus indicus</i> obtidos por OPU/FIV e cultivados em BSA+SFB	40
Introdução	43
Material e Métodos.....	46
Resultados.....	50
Discussão.....	53
Referências.....	58
4. DISCUSSÃO GERAL	63
5. CONCLUSÕES	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
7. APÊNDICES	76

LISTA DE FIGURAS

	Capítulo 1	
FIGURA 1.	Taxa de eclosão de blastocistos bovinos produzidos com complexos <i>cumulus</i> -oócitos <i>Bos taurus indicus</i> coletados por OPU, maturados e fecundados <i>in vitro</i> com 5% ou 20% de O ₂	28
FIGURA 2.	Taxa de prenhez de blastocistos bovinos obtidos com complexos <i>cumulus</i> -oócitos <i>Bos taurus indicus</i> coletados por OPU/MIV e FIV em atmosfera com 5% ou 20% de O ₂	29
	Capítulo 2	
FIGURA 1.	Taxa de prenhez sobre o total de complexos <i>cumulus</i> -oócitos maturados obtidos por OPU de <i>Bos taurus indicus</i> (raças nelore, nelore mocho, brahman e gir leiteiro) e cultivados <i>in vitro</i> com 4mg/mL de BSA + 2% de soro fetal bovino (SFB) ou 4mg/mL de albumina sérica bovina (BSA=Controle)	51

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

TABELA 1.	Taxa de clivagem, total de blastocistos e blastocistos qualidade I em D7 produzidos com complexos <i>cumulus</i> -oócitos <i>Bos taurus indicus</i> coletados por OPU, maturados e fecundados <i>in vitro</i> em atmosfera com 5% ou 20% de O ₂	27
------------------	--	----

Capítulo 2

TABELA 1.	Efeito da fonte protéica no meio sintético de oviduto (SOFaaci) modificado sobre a clivagem, desenvolvimento embrionário e qualidade de blastocistos de vacas <i>Bos taurus indicus</i> de programas comerciais de OPU/PIV.....	50
TABELA 2.	Taxa de clivagem, desenvolvimento e qualidade embrionária ao sétimo dia de cultivo <i>in vitro</i> (CIV) em SOFaaci+4mg/mL de albumina sérica bovina (BSA)+2% de soro fetal bovino (BSA+SFB), 4mg/mL de BSA+2% de SFB no quarto dia de CIV (BSA+SFB _{D4}) ou 4mg/mL de BSA.....	52
TABELA 3.	Taxa de prenhez sobre o total de complexos <i>cumulus</i> -oócitos bovinos maturados e sobre total de embriões transferidos cujo cultivo <i>in vitro</i> em SOFaaci foi suplementado com 4mg/mL de BSA+2% de SFB (BSA+SFB), 4mg/mL de BSA+2% de SFB no quarto dia de cultivo (BSA+SFB _{D4}), ou somente com 4mg/mL de BSA (BSA).....	53

LISTA DE APÊNDICES

- APÊNDICE 1.** Resposta de vacas *Bos indicus* à aspiração por sessão de OPU e produção *in vitro* de blastocistos..... 77
- APÊNDICE 2.** Controle do oxigênio na MIV e FIV de oócitos bovinos: Efeito sobre o desenvolvimento embrionário e taxa de prenhez..... 79

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

INFLUÊNCIA DA ATMOSFERA GASOSA E DA FONTE PROTÉICA SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN* *VITRO* E TAXA DE PREENHEZ EM BOVINOS.

AUTOR: FÁBIO GALLAS LEIVAS
ORIENTADOR: CARLOS ANTONIO MONDINO SILVA
Santa Maria, 18 de maio de 2006.

Diferenças nos protocolos e sistemas de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos incluindo atmosfera gasosa, meios de cultivo e suplementação de proteína utilizados nas diferentes etapas da PIV, influenciam diretamente os resultados finais de desenvolvimento embrionário e prenhez. Dois experimentos foram conduzidos com o objetivo de avaliar a influência da concentração de oxigênio na maturação *in vitro* (MIV) e fecundação *in vitro* (FIV) de oócitos bovinos e da suplementação protéica no cultivo *in vitro* (CIV) de embriões bovinos. Complexos *cumulus*-oócitos imaturos (COC) obtidos de fêmeas *Bos taurus indicus* por aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-sonografia (OPU) foram divididos homogeneamente quanto ao número e a qualidade entre os tratamentos, sendo maturados por 24h, em TCM-199 modificado, acrescido FSH, LH, Estradiol, EGF, Insulina e 10% de SFB. Sêmen congelado selecionado por gradientes de Percoll (2×10^6 células/mL) foi utilizado para a fecundação em Fert-TALP com heparina e PHE, por 18 a 22h. Os prováveis zigotos foram cultivados *in vitro* em SOFaaci por 6 a 9 dias em atmosfera de 5%CO₂, 5%O₂ e 90% N₂. Todas as etapas foram conduzidas em estufa a 39°C com umidade saturada. Os percentuais de clivagem e de blastocistos foram analisados pelo procedimento GLM. As taxas de eclosão dos blastocistos e de prenhez foram comparadas por Qui-quadrado com significância de 5%. No experimento I (11 repetições), a MIV e FIV dos COC (n=1092) foram realizadas sob atmosfera de 5% de CO₂ em ar (**20%O₂**) ou em 5%CO₂, 5%O₂ e 90% N₂ (**5%O₂**). O experimento II foi dividido em 2 etapas (IIa e IIb). No experimento IIa (n=1745 COC) após a MIV e FIV foi realizado o CIV em meio SOFaaci acrescido de 4mg/mL albumina sérica bovina

(**BSA**) ou 4mg/mL de BSA + 2% de soro fetal bovino (**BSA+SFB**). No experimento IIb (n=704 COC), após a MIV e FIV, o CIV foi conduzido nos dois meios do experimento IIa (**BSA e BSA+SFB**) e um terceiro grupo onde o SOFaaci+BSA foi suplementado com 2% de SFB no quarto dia de cultivo (**BSA+SFB4**). As avaliações morfológicas foram efetuadas no D2 (clivagem), D7 (blastocistos e grau de qualidade), D9 (blastocistos eclodidos) e taxa de prenhez aos 45 (experimento I) e 60 dias (experimento II), considerando-se o dia da fecundação como D0. No experimento I, não houve diferença ($P>0,05$) nas taxas de clivagem (69 e 70%), blastocistos em D7 (37 e 38%) e blastocistos qualidade I (79 e 74%) entre atmosfera de 5%O₂ ou 20% de O₂, respectivamente. A taxa de eclosão em D9 sob o total de oócitos MIV foi superior ($P<0,05$) no grupo 5%O₂ (21%) comparado ao grupo MIV e FIV sob 20%O₂ (11%). A taxa de prenhez aos 45 dias dos embriões transferidos (n=278) foi semelhante ($P=0,15$) entre os tratamentos (25,8 e 33,6% para 5%O₂ e 20%O₂ respectivamente). No experimento IIa, a taxa de blastocistos (51,5%) e de blastocistos qualidade I (41%) em D7, foi superior ($P<0,05$) para o grupo BSA+SFB em relação ao BSA (42 e 30%), respectivamente. No experimento IIb, a taxa de blastocistos foi superior ($P<0,05$) no grupo BSA+SFB e semelhante ($P>0,05$) entre o grupo BSA e BSA+SFB4. A taxa de blastocistos qualidade I foi superior para os grupos BSA+SFB (34%) e BSA+SFB4 (32,2%) em comparação ao grupo BSA (19,9%). A taxa de prenhez em relação aos embriões transferidos (n=820) foi semelhante entre os tratamentos nos experimentos IIa e IIb. A taxa de prenhez correspondente aos oócitos colocados para MIV foi superior ($P<0,05$) para o grupo BSA+SFB (16%) comparado ao grupo BSA (12%) no experimento IIa. Não há comprometimento da PIV de embriões bovinos bem como da taxa de prenhez quando a MIV, FIV e CIV são conduzidas com 5%O₂, 5%CO₂ e 90%N₂. A produção *in vitro* de embriões é incrementada pela adição de 2% de SFB ao meio de CIV, sem prejudicar a qualidade morfológica dos mesmos e a taxa de prenhez. A porcentagem de prenhez produzida em relação aos COC colocados para MIV é aumentada pela adição de 2% de SFB ao meio de cultivo *in vitro* SOFaaci+BSA.

Palavras chave: bovinos, oócitos, atmosfera gasosa, fonte protéica, aspiração folicular.

ABSTRACT

Doctoral Thesis in Veterinary Medicine
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

INFLUENCE OF GAS ATMOSPHERE AND PROTEIN SOURCE ON *IN VITRO* EMBRYONIC DEVELOPMENT AND PREGNANCY RATES IN BOVINE

AUTHOR: FABIO GALLAS LEIVAS
ADVISER: CARLOS ANTONIO MONDINO SILVA
Santa Maria May 18, 2006.

The embryonic development and pregnancy rates are influenced by variations in embryo *in vitro* production (IVP) systems and protocols for bovine embryos, such as gaseous atmosphere, culture media and the protein supply adopted in the different steps of IVP. Two studies were performed to evaluate the effect of O₂ tension on *in vitro* maturation (IVM) and fertilization (IVF) of bovine oocytes, and the protein supply in the embryonic *in vitro* culture. Immature *Cumulus*-oocytes complexes (COC) were recovered by transvaginal ultrasound guided follicular aspiration (OPU) from *Bos taurus indicus* donors from commercial programs and randomly assigned according to the number and quality of the COC. Standard bovine IVM procedure was carried out in modified TCM-199, added of FSH, LH, Oestradiol, EGF, insulin and 10% bovine fetal serum (FCS), for 24h. Frozen semen was selected by Percoll gradient (90, 60 and 30%). The insemination was performed with 2x10⁶ spermatozoa/mL in Fert-Talp with heparin and PHE, for 18 to 22h. Presumptive zygotes were *in vitro* cultured (IVC) in SOFaaci during 6 to 9 days with 5%CO₂, 5%O₂ and 90% N₂ in air. All steps of IVC were performed in an incubator at 39°C with saturated humidity. The cleavage and blastocyst rates were analysed by GLM procedure. Hatching, quality I blastocyst and pregnancy rates were compared by Chi-square Test with 5% of significance. In experiment I (11 replicates) IVM and IVF of COC (n=1092) were conducted under 5% CO₂ (**20% O₂**) in air or in 5%CO₂, 5%O₂ and 90% N₂ (**5%O₂**). Experiment II was divided in two steps (IIa and IIb). In experiment IIa (n=1745 COC), the IVM and IVF was followed by *in vitro* culture (IVC) in SOFaaci added of 4mg/mL bovine serum albumin (**BSA**) or 4mg/mL BSA+2% bovine fetal serum (**BSA+FCS**). In experiment IIb (n=704 COC), after standard IVM and IVF, IVC was performed in the two media of Experiment IIa (**BSA and**

BSA+FCS) and in a third group the SOFaaci was added of 4mg/mL BSA+2% FCS (**BSA+FCSD4**) on day 4 of IVC. The viability was accessed by morphological evaluation in D2 (cleavage), D7 (blastocysts and quality categories), D9 (hatched blastocysts), D45 (experiment I) and D60 (experiment II; pregnancy rates), considering day zero (D0) as the fertilization day. In experiment I, no differences were found ($P>0.05$) in cleavage rates (69 and 70%), blastocyst in D7 (37 and 38%) and blastocyst quality I (79 and 74%) in an atmosphere of 5% or 20%O₂, respectively. The hatching rate in D9 considering all COC submitted to IVM was higher ($P<0.05$) for the 5%O₂ group (21%) compared to the IVM and IVF group under 20%O₂ (11%). A pregnancy rate of transferred embryos at 45 days (n=278) was similar ($P=0.15$) between treatments (25.8 e 33.6% for 5%O₂ e 20%O₂, respectively). In experiment IIa blastocyst rates (51%) and quality I blastocysts (41%) in D7, was higher ($P<0.05$) in BSA+FCS group compared to the BSA group (42 and 30%), respectively. In experiment IIb, blastocyst rates were higher ($P<0.05$) in group BSA+FCS (47%) and similar between BSA (34%) and BSA+FCSD4 (43%) groups. Blastocyst rates quality I were higher ($P<0.05$) for groups BSA+FCS (34%) and BSA+FCSD4 (32%), compared to the BSA group (19.9%). A pregnancy rate of the transferred embryos (n=820) was similar between treatments in experiments IIa and IIb. Considering pregnancy rates corresponding only to IVM COC (Experiment IIa), the rates were higher ($P<0.05$) for the BSA+FCS group (16%) than the BSA group (12%). There was no detrimental effect in IVP of bovine embryos and their pregnancy rates when IVM, IVF and IVC were performed in 5%O₂, 5%CO₂ and 90%N₂. IVP of bovine embryos is increased by the addition of 2% FCS to the IVC medium without any detrimental effect on their morphological quality and pregnancy rates. On the other hand, pregnancy rates related to IVM of COC incremented by the addition of 2% de Fc to the IVC medium SOFaaci+BSA.

Key words: bovine, oocytes, gaseous atmosphere, protein source, ovum pick-up.

1. Introdução

A tecnologia da produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos vem sendo aplicada em larga escala com o objetivo de se obter um maior número de produtos nascidos por ano de fêmeas selecionadas. A partir da década de 50, a inseminação artificial (IA) e a criopreservação do sêmen derrubaram barreiras para a disseminação do material genético do macho. No entanto, somente a partir dos anos 80, houve melhor aproveitamento genético de fêmeas, com os avanços científicos determinados pela superovulação e transferência de embriões e, mais recentemente, pela PIV.

Inicialmente, a PIV era realizada apenas com oócitos de fêmeas abatidas ou ovariectomizadas, sendo aplicada como último recurso para multiplicação ou recuperação de material genético. No entanto, após sua associação com a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (OPU), esta tecnologia mostrou-se promissora, permitindo a produção de embriões a partir de animais vivos, até mesmo fêmeas prenhas ou pré-púberes.

A PIV utilizada convencionalmente para estudos básicos de gametas ou suporte para outras biotecnologias, tornou-se também uma importante ferramenta no melhoramento genético. Na década de 90, associada à obtenção crescente de resultados melhores e mais estáveis, passou a ser aplicada comercialmente em vários países. Fatos como estes permitiram o uso da OPU/PIV em animais de diferentes categorias (idade, *status* reprodutivo, aptidão) e não apenas, para animais com infertilidade adquirida ou que não respondem a superovulação, finalidade para a qual foi inicialmente proposta.

O Brasil ocupa uma posição de destaque no cenário mundial no uso desta biotecnologia. Esta técnica tornou-se de eleição por muitos criadores pelas vantagens que apresenta, como a redução do manejo na propriedade, além de oferecer bom índice de produção.

O sucesso da PIV está associado a diferentes variáveis como a raça, idade, fase do ciclo e principalmente o fator individual da doadora que é determinante no número de oócitos viáveis (zero a mais de cem), ou mesmo índice de produção embrionária e bezeros nascidos. Fatores externos como temperatura, nutrição e condições de estresse podem favorecer, ou prejudicar os resultados de acordo com o potencial de cada animal. Além destes fatores, o sêmen utilizado para a fecundação, assim como o protocolo empregado em todo o processo de maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) são decisivos nos índices de produção e qualidade dos embriões.

Nos programas de pesquisa, os protocolos de PIV de embriões bovinos são desenvolvidos e testados com oócitos obtidos de fêmeas destinadas ao abate, cujas rotinas são conduzidas com número fixo de estruturas por volume de meio de cultivo. Os oócitos são selecionados quanto a qualidade e o sêmen é previamente testado para as rotinas de FIV. No entanto, quando se trabalha com OPU, estes protocolos devem ser adaptados, pois tanto a qualidade quanto o número de estruturas recuperadas são variáveis, além da ampla variedade de touros usados na fecundação.

O melhor desempenho da PIV também é dependente da constante melhoria do sistema de produção, incluindo a MIV, FIV e o CIV. Em bovinos, tanto a MIV como a FIV dos oócitos é conduzida por 18 à 24h, à temperatura de 39°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar com umidade saturada, sendo o CO₂ utilizado para controlar o pH dos meios tamponados com bicarbonato. A concentração de oxigênio geralmente não é controlada nestas fases, sendo aproximadamente 20%, o que difere muito da concentração de 5% de O₂ encontrada no trato reprodutivo das

fêmeas, ou mesmo do líquido de folículos em crescimento (MASTROIANNI & JONES, 1965). A alta concentração de oxigênio pode ser tóxica para oócitos e embriões de mamíferos (McNATTY, 1978), pela formação de radicais livres e liberação de substâncias tóxicas no meio. O CIV dos embriões com baixa concentração de oxigênio (5%O₂) apresenta melhores resultados de produção de blastocistos e também de qualidade dos mesmos, especialmente em sistemas de cultivo desprovidos de células somáticas (GORDON, 2003). O controle da concentração de oxigênio durante a MIV e FIV para níveis próximos aos do trato reprodutivo pode ser uma alternativa para a melhoria do processo de PIV.

No que se refere ao sistema de cultivo *in vitro* (CIV), são utilizados diferentes sistemas que possuem como base meios simples ou meios complexos, aos quais são adicionados aminoácidos e vitaminas, além de sais e macromoléculas com funções específicas. A atmosfera gasosa com 5% de O₂ é utilizada na tentativa de mimetizar o ambiente encontrado no oviduto e embora 5% de O₂ não aumente os índices de produção quando comparada a sistemas que utilizam o co-cultivo com células somáticas, a mesma está associada à produção de embriões de melhor qualidade (GORDON, 2003; ARANTES et al., 2003). O soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA) são as fontes protéicas mais utilizadas na PIV, na maioria dos sistemas, associadas a aminoácidos (DUQUE et al., 2003).

O SFB e a BSA tornam o meio indefinido e semidefinido respectivamente, por constituírem uma associação de proteínas, fatores de crescimento, hormônios, entre outras substâncias quantitativa e qualitativamente não controladas. No entanto, a adição de uma destas fontes protéicas aumenta significativamente o desenvolvimento embrionário (KHURANA & NIEMANN, 2000). Holm et al. (1999) comprovaram a necessidade de uma destas fontes protéicas durante a MIV e/ou FIV para que a fecundação e o desenvolvimento embrionário ocorram adequadamente em meios de CIV definidos. Os meios definidos

têm sido objetos de estudos que visam o incremento da qualidade dos embriões e também para determinar as reais necessidades de oócitos e embriões num sistema de PIV. No entanto os índices de produção com meios quimicamente definidos são relativamente baixos e os dados existentes pouco expressivos para análise de taxa de prenhez (GORDON, 2003).

O sistema de cultivo utilizado durante todas as fases da PIV é de fundamental importância, pois dele depende os índices de produção e principalmente a qualidade do embrião bovino (GORDON, 2003). Até o momento, vários sistemas vêm sendo propostos para melhorar os índices de desenvolvimento. O uso de diferentes atmosferas gasosas, meios suplementados por diversas substâncias e fatores de crescimento nas etapas de produção *in vitro*, bem como a retirada total ou parcial do soro, parecem ser os principais responsáveis pelas taxas de produção. A redução da concentração de soro durante as diferentes fases da PIV é necessária para se obter embriões de melhor qualidade. Porém, até o presente momento, o seu uso parece ser essencial para obtenção de melhores resultados de desenvolvimento embrionário.

Este estudo teve como objetivo avaliar a produção de blastocistos, sua qualidade e a taxa de prenhez em diferentes sistemas de PIV com oócitos bovinos *Bos taurus indicus* obtidos por OPU. No primeiro artigo, para avaliar o efeito da concentração de oxigênio durante a MIV e FIV, estas etapas foram realizadas sob atmosfera gasosa de 5% de CO₂, 5% de O₂, 90%N₂ (grupo 5%O₂) ou em 5% de CO₂ em ar (grupo 20%O₂=Controle). No segundo artigo, avaliou-se em dois experimentos, o efeito da adição de 2% de SFB desde o início ou a partir do quarto dia de CIV em meio de cultivo *in vitro* com concentração constante de 0,4% de BSA.

2. Capítulo 1

Concentração de oxigênio na MIV e FIV de oócitos bovinos: Efeito sobre o desenvolvimento embrionário e a taxa de prenhez.

*(Oxygen tension in the IVM and IVF of bovine oocytes: effect on the embryonic
development and pregnancy rate)*

F.G. Leivas^{1,2*}, D.S. Brum², W.P. Saliba², M.T.T. Alvim², M.L. Bernardi³,
M.I.B. Rubin¹, C.A.M. Silva¹

¹Embryolab – Laboratório de Embriologia Animal, Departamento de Clínica de Grandes Animais, Prédio 97, Bloco 4, Área Sul, Sala 434. Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário Av. Roraima, 1000. 97.105-900 Santa Maria RS Brasil. www.ufsm.br/embryolab ² Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, UFRGS. 91.540-000 Porto Alegre, RS. ³Nova Índia-Cenatte Embriões, C.P. 570, 38.001-970, Uberaba-MG.

Artigo a ser submetido ao periódico **Animal Reproduction**

* Autor para correspondência: fabioleivas@yahoo.com.br ou www.ufsm.br/embryolab.

Resumo

O efeito da concentração de oxigênio sobre a MIV e FIV foi avaliado com 1092 oócitos viáveis de 48 doadoras em programas comerciais *Bos taurus indicus* em 11 repetições de OPU/PIV. Os complexos *cumulus*-oócitos imaturos (COC) de cada doadora foram distribuídos em grupos de 10 a 20 de forma homogênea e aleatória quanto ao número e à qualidade morfológica. A maturação foi conduzida em gotas de 100 μ L de TCM-199 acrescido de FSH, LH e 10% de SFB, sob óleo mineral, em estufa por 24h, a 39°C, umidade saturada e atmosfera de 5% de CO₂ em ar (grupo **20% O₂**) ou 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂ (grupo **5% O₂**). Sêmen congelado *Bos taurus indicus* foi selecionado por gradientes de Percoll sendo utilizados 2x10⁶ espermatozoides/mL para a fecundação. A FIV foi conduzida em gotas de 100 μ L de Fert-TALP com heparina e PHE por 18 à 24h, em condições atmosférica idêntica à MIV. O cultivo foi efetuado em gotas de 100 μ L de SOFaaci, por 6 a 8 dias em estufa a 39°C, umidade saturada, com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% N₂. Parte dos embriões produzidos foram avaliados *in vitro* até a eclosão dos blastocistos em D9 (D0=dia da fecundação) outra parte foi avaliada quanto à taxa de prenhez após transferência para receptoras. Os percentuais de clivagem e de blastocistos foram analisados pelo procedimento GLM. As taxas de eclosão dos blastocistos e de prenhez foram comparadas por Qui-quadrado com significância de 5%. Não houve diferença na taxa de clivagem (69.6 e 70.4%), no desenvolvimento embrionário (37.3 e 38.4%) e na taxa de blastocistos qualidade I em D7 (30.8 e 30.4%) entre os grupos 5% O₂ e 20% O₂, respectivamente. A eclosão em D9, considerando o total de oócitos, foi superior com 5% de O₂ (21.3 vs 10.8%). No entanto, a taxa de prenhez foi similar (P=0.15) entre os grupos 5% O₂ (25.8%; 34/132) e 20% O₂ (33.6%; 49/146). A produção/qualidade embrionária e a taxa de prenhez observados indicam que é possível utilizar a concentração de 5% de oxigênio durante todo o processo de PIV em programas comerciais de OPU/PIV.

Palavras Chave: concentração de tensão oxigênio, OPU, maturação *in vitro*, fecundação *in vitro*

Abstract

In order to evaluate the effect of O₂ tension in the IVM and IVF process, 11 replicates of OPU/IVP were performed using 1092 viable oocytes obtained from 48 cow donors commercial programs. *Cumulus*-oocytes complexes (COC) from each donor were homogeneously and randomly distributed in two treatments. The IVM was performed in TCM-199 with hormones and FCS. The IVF was performed in Fert-TALP medium with heparin and PHE using Percoll gradient selected spermatozoa from *Bos taurus indicus* bull. During IVM and IVF, the oocytes were incubated in 5% CO₂ in air (Group **20%O₂**) or 5%CO₂, 5%O₂, 90% N₂ (Group **5% O₂**) for 18-24h, at 39°C. The embryos were incubated in SOFaaci , at 39°C, for 6-8 days with 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ . Part of the embryos (n=187 COC) were evaluated until Day 9 when hatching rates were recorded. In the rest of embryos produced at Day 7 (n=905), pregnancy rate was evaluated after the transfer to recipients. The cleavage and blastocyst rates were analysed by GLM procedure. Hatching, quality I blastocyst and pregnancy rates were compared by Chi-square Test with 5% of significance. There were no differences in the cleavage (69.6 and 70.4%), embryo development (37.3 and 38.4%) and quality I blastocyst rates in D7 (30.8 and 30.4%) between 5% O₂ and 20% O₂ groups, respectively. The hatching rates at Day 9, considering the number of oocytes were higher in the 5% O₂ group (21.3 vs 10.8). The pregnancy rates were similar (P=0.15) between 5% O₂ (25.8%; 34/132) and 20% O₂ (33.6%; 49/146) groups. The production/embryo quality and the pregnancy rate observed indicate the possibility of using a 5% oxygen tension during the whole procedure of IVP for cattle OPU/IVP.

Key words: oxygen tension, OPU, *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, pregnancy.

Introdução

A tecnologia de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos está em constante desenvolvimento e nos últimos anos alcançou resultados mais estáveis que possibilitaram sua aplicação comercial. No entanto, os índices de prenhez alcançados são inferiores aos obtidos com embriões obtidos *in vivo* (Merton *et al.*, 2003). Um fato importante a ser considerado é a diferença existente nos sistemas de produção *in vitro* quando se trabalha com oócitos provenientes de vacas de matadouros em comparação aos obtidos por aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-sonografia (OPU), devido às diferenças no método de coleta, qualidade e seleção dos oócitos, número de estruturas, *status* hormonal da doadora e touros utilizados.

O desenvolvimento embrionário é afetado pela qualidade dos oócitos aspirados e pelas condições de maturação *in vitro* (MIV) e de fecundação *in vitro* (FIV). A MIV deficiente, especialmente a maturação citoplasmática, está relacionada com a baixa formação de blastocistos (Oyamada e Fukui, 2004). A atmosfera gasosa comumente utilizada na MIV é de 5% CO₂ em ar, não sendo controlada a concentração de oxigênio, ficando esta próxima dos níveis atmosféricos (20%). A concentração de oxigênio

no trato reprodutivo das fêmeas bovinas é de aproximadamente 5%. (Mastroianni e Jones, 1965; Bavister, 1995). Altos níveis de oxigênio (20%) são tóxicos para diferentes tipos de células de mamíferos, incluindo oócitos e espermatozóides, provavelmente pela formação de radicais livres que causam severos danos celulares como oxidação, inativação de enzimas e danos ao DNA (Umaoka *et al.*, 1992). No cultivo *in vitro* (CIV) de embriões bovinos, a concentração de 5% de O₂ resulta em melhores índices de desenvolvimento embrionário e qualidade dos embriões (Gordon, 2003). Fatores de crescimento ou antioxidantes têm sido utilizados durante a MIV e CIV buscando prevenir os efeitos do estresse oxidativo (Alli *et al.*, 2003; Oyamada e Fukui, 2004). A concentração de O₂ do líquido folicular decresce com o crescimento do folículo (Mcnatty, 1978), sugerindo que a baixa concentração de oxigênio (5%) possa ser favorável para a maturação dos oócitos.

Em camundongos, a atmosfera de 5% de O₂ na MIV não alterou a capacidade de desenvolvimento dos oócitos (Eppig e Wigglesworth, 1995; Adam *et al.*, 2004). Já em suínos, a qualidade dos embriões produzidos com oócitos MIV, avaliada por Kikuchi *et al.* (2002), com 5% de O₂ foi superior a 20% de O₂. De Matos *et al.* (1996) relataram desenvolvimento mais rápido até o estágio de blastocisto (6 dias) com oócitos MIV sob 5% de O₂ e sugeriram maior resistência à criopreservação de oócitos e embriões produzidos neste sistema. A redução para 5% de oxigênio durante a MIV provocou o retardo da maturação (Caiado *et al.*, 2003),

mas Azambuja *et al.* (1993) relataram maiores taxas de mórulas e blastocistos com 20% O₂ comparado a 5%. Hashimoto *et al.* (2000) concluíram ser benéfica a MIV com 5% de O₂ em bovinos. Kruij *et al.* (2000) relataram que a MIV foi prejudicial ao desenvolvimento embrionário sob atmosfera de 20% de oxigênio e Siqueira-Pyles *et al.* (2004) produziram embriões com oócitos transportados em tubos gaseificados com 5% de oxigênio durante a MIV.

Durante a FIV, a concentração de oxigênio usualmente não é controlada, sendo utilizado 5% de CO₂ em ar, independentemente de outros fatores tais como meio, volume, densidade dos oócitos e touros utilizados. Existem poucos estudos relacionados com o efeito da concentração de O₂ afetando o sucesso da FIV e a produção de blastocistos, como em camundongos e humanos (Dumoulin *et al.*, 1995). Em bovinos, foi demonstrado que a redução do O₂ durante a FIV foi benéfica (Lazzari *et al.*, 1998). A concentração de 5% de O₂ foi utilizada por Galli *et al.* (2001). com sucesso para touros com baixas taxas de fecundação em protocolos convencionais (20% O₂). Takahashi e Kanagawa (1998) não detectaram diferença na taxa de fecundação, porém o desenvolvimento embrionário foi superior no grupo onde a FIV foi conduzida sob atmosfera de 5% de O₂.

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a influência da atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ em comparação a 5% de CO₂ em

ar (20% de O₂) durante a MIV e FIV de oócitos bovinos obtidos por OPU, sobre a produção, qualidade dos embriões e taxa de prenhez.

Material e Métodos

Coleta dos Complexos *cumulus*-oócitos (COC)

Quatorze novilhas da raça Brahman, com idade de 13 a 18 meses, cíclicas, mantidas em pastagem de *Brachiaria decumbens* e suplementadas diariamente com silagem de sorgo *ad libitum*, serviram como doadoras de oócitos durante os meses de junho a setembro de 2004, na Região de Uberaba, MG, Brasil. As novilhas foram submetidas no mínimo a dois e, no máximo, a quatro procedimentos de OPU, com intervalos de 15 dias. Foram realizadas 48 sessões de OPU-PIV em 11 dias diferentes, sendo coletados 1092 COC viáveis para MIV. Para OPU foi utilizado aparelho de ultra-som Aloka SSD-500, com transdutor setorial de 5 MHz (UST9111), acoplado à guia transvaginal. A aspiração dos folículos foi realizada com agulha 18G (COOK-VOPAL1855), conectada a uma linha de aspiração (COOK-VOPAL1800) e bomba de vácuo (COOK-VMAR500), com vazão de 15 mL de meio por minuto.

Os COC aspirados foram mantidos em tubos de 45mL em PBS (Nutricell, Campinas, Brasil), com 1% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 5UI de heparina/mL. O conteúdo aspirado foi submetido à lavagem nesta

mesma solução e filtrado. Imediatamente após identificados os COC foram classificados sob estereomicroscópio, sendo considerados viáveis aqueles de qualidade I, II, e III (De Loos *et al.*, 1989).

Exceto onde indicado, todos componentes químicos foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Desenho Experimental

Os oócitos de cada doadora foram distribuídos de forma homogênea, quanto ao número e qualidade, em dois tratamentos. A MIV e a FIV foram realizadas em 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ (grupo 5%O₂) ou em 5% de CO₂ em ar (grupo 20%O₂=Controle).

Maturação *in vitro*

A maturação foi conduzida com 10 a 20 COC, em gotas de 100µL de TCM-199 acrescido de 10% de SFB, 5µg/mL de FSH, 50µg/mL de LH, 1µg/mL de estradiol, 100µg/mL de EGF, 6.25µg/mL de Insulina, 22µg/mL de piruvato e gentamicina. O meio foi coberto por óleo mineral em placas de Petri 35x15mm mantidas em estufa de cultivo por 24 horas a 39°C, em umidade saturada e atmosfera gasosa de 5% de CO₂ em ar (grupo 20%O₂) ou 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ (grupo 5%O₂).

Fecundação *in vitro*

Decorrido o período de MIV, os COC foram transferidos para gotas de 100 μ L de meio FERT (Parrish *et al.* 1986) acrescido de 22 μ g/mL de piruvato, 6 mg/mL de BSA, 10 μ g/mL de heparina, 20 μ M de penicilamina, 10 μ M de hipotaurina e 2 μ M de epinefrina. Para a fecundação utilizou-se sêmen congelado de dois touros *Bos taurus indicus*, sendo utilizado o mesmo sêmen para todos os COC, em cada repetição. Os espermatozoides foram selecionados por gradientes de 90, 60 e 30% de Percoll e a dose inseminante foi 2x10⁶ espermatozoides/ml. O dia da FIV foi considerado dia zero (D0) e o co-cultivo com os espermatozoides foi de 18 a 24 horas a 39°C, em umidade saturada e atmosfera gasosa de 5% de CO₂, 5% de O₂, 90% de N₂ (grupo 5%O₂) ou 5% de CO₂ em ar (grupo 20%O₂=Controle).

Cultivo *in vitro*

Os prováveis zigotos foram submetidos a sucessivas pipetagens para retirada das células do *Cumulus oophorus* e imediatamente após, transferidos para gotas de 100 μ L de meio SOFaaci com 4 mg/mL de BSA (Holm *et al.* 1999) sob óleo mineral em placas de Petri 35x15mm. Os embriões foram cultivados por 6 a 8 dias em estufa a 39°C, com umidade saturada e atmosfera gasosa com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂.

Avaliação e transferência embrionária

O efeito da concentração de oxigênio durante a MIV e FIV foi avaliado *in vitro* e *in vivo* aos 2, 7, 9 e 45 dias após a FIV (clivagem, embriões, eclosão e prenhez, respectivamente). As taxas de clivagem e de blastocistos foram avaliadas considerando o total de COC (n=1092). O desenvolvimento de 187 COC foi acompanhado até o D9 para a avaliação da eclosão. Os demais COC (n=905) foram avaliados morfológicamente no D7 (IETS, 1998), envasados em palhetas de 0.25 mL em meio TCM-Hepes com 10% SFB para transporte em caixas térmicas, à temperatura ambiente (25-30°C) até o local da transferência. A inovulação foi efetuada em receptoras sincronizadas em até 8 horas após o envase. O diagnóstico de gestação foi conduzido através de exame retal e confirmado por ultra-sonografia. Avaliou-se o índice de prenhez em relação ao número de embriões transferidos e em relação ao total de COC viáveis em maturação.

Análise estatística

Os percentuais de clivagem e de blastocistos foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM (SAS, 1998). As taxas de eclosão, de blastocistos de qualidade I e de prenhez foram comparadas pelo teste Qui-quadrado. Em ambos os casos, o nível de significância utilizado foi o de 5%.

Resultados

A taxa de clivagem e o desenvolvimento embrionário até o sétimo dia de cultivo *in vitro* foram similares entre as diferentes concentrações de O₂ e estão apresentados na Tabela 1. A qualidade morfológica dos blastocistos produzidos ao sétimo dia de CIV não foi influenciada pelo tratamento. A taxa de blastocistos qualidade I produzidos em D7 foi de \pm 80%, não diferindo entre os tratamentos (Tabela 1).

Tabela 1. Taxa de clivagem, total de blastocistos e blastocistos qualidade I em D7 produzidos com complexos *cumulus*-oócitos *Bos taurus indicus* coletados por OPU, maturados e fecundados *in vitro* em atmosfera com 5% ou 20% de O₂.

Atmosfera gasosa na maturação e fecundação <i>in vitro</i>	Complexos <i>cumulus</i> -Oócitos n	Clivagem %	Blastocistos em D7	
			total %	qualidade I %
5% de Oxigênio	448	69.6 ^a	37.2 ^a	30.8 ^a
20% de Oxigênio (controle)	457	70.4 ^a	37.4 ^a	30.4 ^a

Não houve diferença (P>0.05)

A taxa de eclosão, no dia 9 de cultivo, considerando o número de oócitos (n=187), foi superior ($P<0,05$) para o grupo 5% de O_2 , enquanto que a taxa de eclosão sobre os blastocistos em D9 não diferiu (Fig. 1).

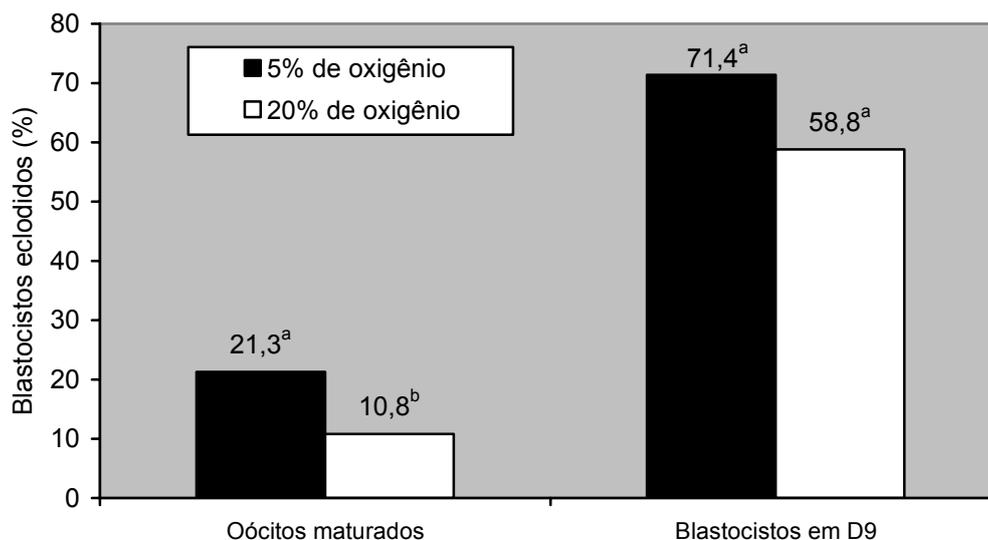


Figura 1. Taxa de eclosão de blastocistos bovinos produzidos com complexos *cumulus*-oócitos *Bos taurus indicus* coletados por OPU, maturados e fecundados *in vitro* com 5% ou 20% de O_2 ($P<0.05$).

A taxa de prenhez foi avaliada considerando-se os embriões transferidos (n=278) e os COC maturados (n=905), não havendo diferença ($P>0.05$) entre a atmosfera de 5% e 20% de O_2 (Fig. 2).

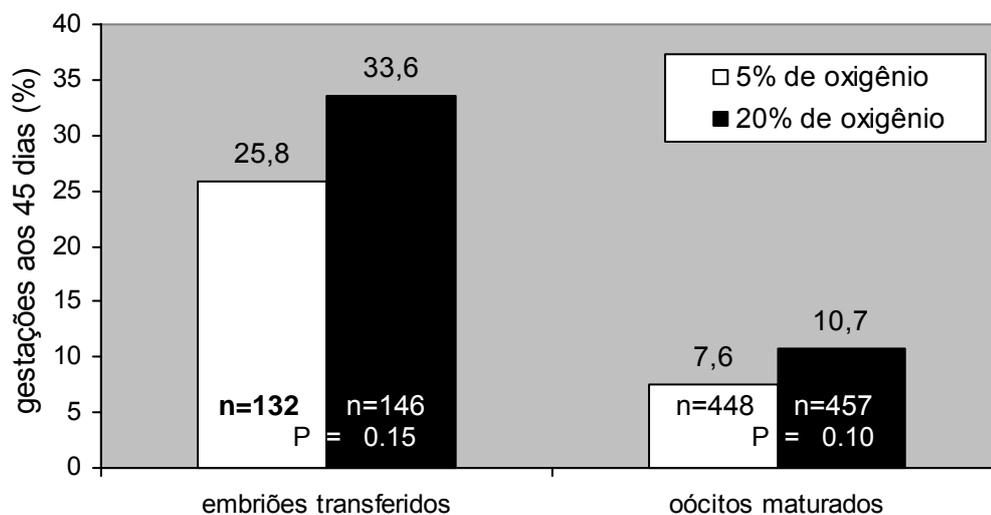


Figura 2. Taxa de prenhez de blastocistos bovinos obtidos com complexos *cumulus*-oócitos *Bos taurus indicus* coletados por OPU/MIV e FIV em atmosfera com 5% ou 20% de O₂.

Discussão

A concentração de oxigênio (5%) no trato reprodutivo das fêmeas é menor que a do ar atmosférico (20%). Concentrações similares ao do ar atmosférico podem causar danos em células de mamíferos incluindo oócitos, espermatozóides e embriões (Mastroianni e Jones, 1965; Umaoka *et al.*, 1992). Durante a MIV, convencionalmente não se controla a concentração de O₂, estando a mesma em torno de 20%. Embora a MIV seja uma etapa muito importante para o futuro desenvolvimento embrionário, poucas pesquisas estudaram o efeito da diminuição da

concentração de O₂ durante a MIV para níveis próximos ao encontrado no trato reprodutivo dos bovinos. No presente estudo, a redução da concentração de oxigênio durante a maturação e fecundação *in vitro* de 20% para 5% não impediu o desenvolvimento embrionário, sendo a taxa de clivagem e de blastocistos em D7 semelhante entre os tratamentos (Tabela 1). Azambuja *et al.* (1993) e Caiado *et al.* (2003) relataram ser benéfica a MIV sob 20% de O₂, enquanto outras equipes (Hashimoto *et al.*, 2000; Kruij *et al.*, 2000; Siqueira-Pyles *et al.*, 2004) obtiveram sucesso com a MIV sob baixa (5%) concentração de oxigênio.

No sistema de aspiração de OPU os oócitos obtidos podem ser recuperados com poucas camadas de células do *Cumulus oophorus* e com isto a maturação e posterior desenvolvimento embrionário podem ser comprometidos (Gordon, 2003), pois estas células contribuem para a formação do pró-núcleo masculino e subsequente desenvolvimento do oócito bovino (Chian *et al.*, 1994). Corroborando essa afirmação, Konishi *et al.* (1996) demonstraram o efeito benéfico das células da granulosa no meio de maturação sobre a qualidade dos oócitos com 4 ou menos camadas de células, coletados por OPU. Nos programas de pesquisa, os protocolos de PIV são conduzidos com oócitos selecionados pela qualidade I e II, maturados e fecundados em grupos de 20 a 40 oócitos/gota, sob atmosfera de 20% de oxigênio. Esses oócitos possuem grande quantidade de células do *Cumulus oophorus* que podem reduzir a concentração de O₂ (Konish *et al.*, 1996). Nosso trabalho foi conduzido

com oócitos de qualidade I, II, III, obtidos por OPU, com grupos de 10 a 20 oócitos/gota. Estes aspectos podem ter interferido nos resultados, não somente pela menor quantidade de células dos complexos *cumulus*-oócitos recuperados, como pela menor densidade de oócitos por volume de meio quando comparado a pesquisas conduzidas com oócitos de vacas de matadouro. A concentração de 5% de oxigênio pode ter favorecido a MIV e FIV, similarmente ao que ocorre na PIV convencional com oócitos de qualidade I e II, que possuem maior número de camadas de células do *Cumulus oophorus*, usualmente mantidos sob alta concentração de oxigênio (20%).

Quando Pinyopummintr e Bavister (1995) avaliaram o efeito da condição atmosférica sobre a MIV e FIV em bovinos, a maturação com 20% de O₂, determinou taxa superior de oócitos em metáfase II, comparada a 5 e 10% de O₂. Quando o efeito do O₂ (5, 10 e 20%) foi pesquisado somente durante a FIV, a fecundação ocorreu adequadamente e foi superior (71%) sob atmosfera de 20% de O₂.

Já foi demonstrado que altas concentrações de glicose podem ser geradoras de radicais livres (Iwata *et al.*, 1998). No entanto, Oyamada e Fukui (2004) concluíram que sob baixa concentração de oxigênio, determinadas concentrações de glicose possuem efeito benéfico durante a MIV. No nosso trabalho não foi adicionado glicose ao meio de maturação, porém a fonte protéica necessária para a maturação e acrescida ao meio, foi o soro fetal bovino (10%), que entre seus

constituintes possui a glicose. A presença de glicose pode ter favorecido a maturação sob concentração de 5% de O₂. Na presente pesquisa, o EGF, componente do meio de MIV, também pode ter contribuído para o desenvolvimento embrionário dos COC MIV e FIV sob 5% de O₂, pois a adição de fatores de crescimento como o EGF ou antioxidantes como a cisteamina, apesar de não melhorarem a maturação nuclear de oócitos bovinos, aumentaram a taxa de fecundação e desenvolvimento embrionário de oócitos MIV, FIV, CIV individualmente sob atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ (Oyamada e Fukui, 2004), provavelmente pela estimulação de fatores promotores da maturação como a glutathiona (GSH).

Na avaliação da qualidade dos embriões produzidos houve maior eclosão de blastocistos produzidos com oócitos do grupo MIV e FIV com 5%O₂ (21.3% vs. 10.8%). Por outro lado, esta diferença não foi constatada na taxa de eclosão em relação aos blastocistos em D9 (Tabela 1), nem na taxa de prenhez após transferência para receptoras (Fig. 2), indicando não haver diferença na qualidade dos embriões produzidos nestes dois sistemas. As informações fornecidas pelas avaliações *in vitro* dos embriões, tais como taxa de eclosão e número de células dos blastocistos (Gordon, 2003), podem ter aplicação limitada, pois se sabe que existem diferenças entre as avaliações realizadas *in vitro* e *in vivo* (taxa de prenhez). Com os embriões produzidos neste experimento, apesar da taxa de eclosão em relação aos oócitos ter sido superior no

grupo MIV e FIV sob 5% de oxigênio (Tabela 1), não se constatou diferença na taxa de prenhez em relação aos embriões transferidos ($P=0.15$), nem em relação aos oócitos MIV ($P=0.10$; Fig. 2). Em suínos, a qualidade dos blastocistos gerados de oócitos MIV sob 5% de O_2 foi superior aos oócitos MIV sob 20% de O_2 (Kikuchi *et al.*, 2002). A baixa concentração de oxigênio pode ser considerada promotora da maturação citoplasmática melhorando o desenvolvimento embrionário pela redução do estresse oxidativo (Kikuchi *et al.*, 2002; Adam *et al.*, 2004) e pela maior produção de substâncias envolvidas na estimulação da maturação dos oócitos (Oyamada e Fukui, 2004). A maior taxa de eclosão em relação aos oócitos MIV obtida nesta pesquisa indica que o desenvolvimento dos embriões foi mais rápido no grupo dos oócitos MIV e FIV sob 5% de O_2 , sugerindo que a baixa concentração de oxigênio durante a MIV e FIV pode ter estimulado o desenvolvimento embrionário. Embora o incremento nas taxas de desenvolvimento embrionário e prenhez não tenha sido significativo, a utilização de 5% de oxigênio poderia ser utilizada em programas de PIV, com o objetivo de estimular o desenvolvimento embrionário e inclusive melhorar a resistência à criopreservação de oócitos MIV e embriões PIV (De Matos *et al.*, 1996), pois sabe-se que embriões que se desenvolvem mais rapidamente possuem maior resistência ao congelamento.

A diminuição da concentração de oxigênio durante o período de fecundação *in vitro* não interferiu na taxa de fecundação, mas resultou em

desenvolvimento embrionário superior ao observado no grupo 20%O₂ (Takahashi e Kanagawa, 1998). Também em bovinos, a pesquisa de Lazzari *et al.* (1998) demonstrou benefícios na realização da FIV com 5% de O₂. Galli *et al.* (2001) conseguiram produzir blastocistos conduzindo a FIV com 5% de O₂ com touros que sob atmosfera com 20% de O₂ não obtinham sucesso. No presente estudo, a fecundação realizada sob 5% de oxigênio, similarmente ao processo que ocorre *in vivo*, não influenciou na taxa de clivagem e no desenvolvimento embrionário. A FIV não foi avaliada separadamente, somente em conjunto com a MIV sob 5% de oxigênio. Assim, ainda fica por esclarecer se a concentração de oxigênio afeta do mesmo modo os processos de maturação e fecundação.

Os resultados deste trabalho demonstram a viabilidade do sistema de PIV (MIV, FIV e CIV) ser realizado totalmente sob concentração de oxigênio reduzida a 5%, o que pode ser benéfico para a qualidade dos embriões, devido a possível redução na formação de radicais livres, que evita danos celulares aos oócitos e espermatozóides (Umaoka *et al.*, 1992). Também pode ser considerada a alternativa de uso de apenas uma estufa para todas as fases da PIV, bem como a possibilidade do transporte dos oócitos do local de coleta ao laboratório de PIV em tubos gaseificados (Siqueira-Pyles *et al.*, 2004). Outros aspectos ainda carecem entendimento, como a densidade de oócitos por volume de meio, o uso de diferentes fontes energéticas e ainda, o comportamento destes oócitos MIV e dos embriões produzidos quando submetidos à criopreservação.

Nossos resultados mostram a possibilidade da maturação e fecundação *in vitro* serem conduzidas com a concentração de 5% de oxigênio, pois não houve comprometimento da produção de blastocistos, da sua qualidade e da taxa de prenhez. Com isso é possível o uso 5% de O₂ durante todas as fases da PIV de embriões bovinos em programas comerciais de OPU/PIV.

Referências

Adam AAG, Takahashi Y, Nagano SKM. 2004. Effects of oxygen tension in the gas atmosphere during *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and *in vitro* culture on the efficiency of *in vitro* production of mouse embryos. *Japanese J Vet Research*, 52(2):77-84.

Alli AA, Biloudeau JF, Sirard MA. 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology*, 59:939-949.

Azambuja RM, Moreno JF, Kraemer D. 1993. Effect of gas atmosphere on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 39:184.

Bavister BD. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod*, 1:91-148.

Caiado VSDC, Barreto LSS, Garcia JM. 2003. Influência do suplemento de macromoléculas e da atmosfera gasosa na maturação de oócitos

bovinos. *In* Abstracts of the 17th Annual Meeting of Brazilian Embryo Technology Society, 2003, Fortaleza, CE, Brazil: SBTE. pp.272.

Chian RC, Niwa K, Sirard MA. 1994. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 41:1499-1508.

De Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez, AG, Matkovic M. 1996. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol Reprod Dev*, 45:451-457.

De Loos F, Van Vliet C, Van Maurik P, Kruip TA. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Res*, 24:197-204.

Dumoulin JCM, Vanvuchelen RCM, Land JA, Pieters MH, Geraedts JP, Evers JL. 1995. Effect of oxygen concentration on *in vitro* fertilization and embryo culture in the human and the mouse. *Fertil and Steril*, 63:115-119.

Eppig JJ, Wigglesworth K. 1995. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown *in vitro*: oxygen concentration. *Mol Reprod Dev*, 42:447-456.

Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, 55:1341-1357.

Gordon I. 2003. *Laboratory Production of Cattle Embryo*. 2.ed. CAB International, University Press, Cambridge, England. pp.548.

Hashimoto S, Minami N, Takakura R, Yamada M, Imai H, Kashima N.

2000. Low oxygen tension during *in vitro* maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus oocyte complexes. *Mol Reprod Dev*, 57:353-360.

Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callensen H. 1999. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaaci medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. *Theriogenology*, 52:683-700.

IETS. 1998. Certification and identification of the embryo. In: STRINGFELLOW DA, SEIDEL SM. (Eds.). 3rd *Manual of the International Embryo Transfer Society*. Savoy, IL, USA: International Embryo Transfer Society. pp.103-116.

Iwata H, Akamatsu S, Minami N, Yamada M. 1998. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. *Theriogenology*, 50:365-375.

Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H, Akita T, Nagai T. 2002. Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system. *Biol Reprod*, 66:1033-1041.

Konishi M, Aoyagi Y, Takedomi T, Itakura H, Itoh T, Yazawa S. 1996. Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved *in vitro* development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guide transvaginal aspiration. *Theriogenology*, 45: 573-581.

Kruip TAM, Beverage MM, Kemp B. 2000. Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. *Theriogenology*, 53:611-618.

Lazzari G, Crotti GN, Duchi R. 1998. Lowering the oxygen level during IVF improves the fertilizing ability of bovine sperm and does not affect the developmental capacity of the embryos obtained. *In: Abstracts of 19th Scientific Meeting of the A.E.T.E. 1998, Rolduc, Holland.* Rolduc: European Embryo Transfert Association. pp.198.

Mastroianni LJr, Jones R. 1965. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *J Reprod Fertil*, 9:99-102.

McNatty KP. 1978. Follicular fluid. In Jones, RE (Ed.). *The vertebrate ovary.* New York, NY, USA: Plenum Press. pp.215-259.

Merton JS, Roos APW, Mullaart E, Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59:651-674.

Oyamada T, Fukui Y. 2004. Oxygen tension and medium supplements for *in vitro* maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *J Reprod Dev*, 50(1):107-117.

Parrish JJ, Susko PJL, Liebfried RML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25:591-600.

Pinyopummintr T, Bavister BD. 1995. Optimum gas atmosphere for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 44:471-477.

SAS user's guide: Statistical Analysis System.1998. Release 6.12. SAS Institut, Cary, NC, USA.

Siqueira-Pyles ESC, Pedrazzi CAF, Landim-Alvarenga FC. 2004. Utilização de estufa portátil (LIFE) para a produção *in vitro* de embriões bovinos. *Acta Sci Vet Supp*, 32:94.

Takahashi Y, Kanagawa H. 1998. Effect of oxygen concentration in the gas atmosphere during *in vitro* insemination of bovine oocytes on the subsequent embryonic development *in vitro*. *Japanese Vet Med Sci*, 60(3):365-367.

Umaoka Y, Noda Y, Narimoto K, Mori T. 1992. Effect of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. *Mol Reprod Dev*, 31:28-33.

3. Capítulo 2

Aumento da taxa de gestações com embriões *Bos taurus indicus* obtidos por OPU/FIV e cultivados em BSA ou SBS+SFB

(Improvement of pregnancy rates with *Bos taurus indicus* embryos obtained by OPU/IVF and cultured with BSA+FCS)

Fábio Gallas Leivas^{a,b*}, Daniela dos Santos Brum^b, Wilson Pardini Saliba^b,
Múcio Túlio Teixeira Alvim^b, Mari Lourdes Bernardi^c, Sandra Elisa
Pozzobon^s, Mara Iolanda Batistella Rubin^a, Carlos Antonio Mondino Silva^a

^a Embryolab – Laboratório de Embriologia Animal, Departamento de Clínica de Grandes Animais Prédio 97, Bloco 4-, Área Sul, Sala 434. Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário. Av. Roraima, 1000 97.105-900 Santa Maria RS Brasil. www.ufsm.br/embryolab ^b Nova Índia-Cenatte Embriões, C.P. 570, 38.001-970, Uberaba, MG. Brasil ^c Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, UFRGS. 91.540-000 Porto Alegre, RS. Brasil

* Autor para correspondência: fabioleivas@yahoo.com.br or www.ufsm.br/embryolab.

Resumo

Para avaliar o efeito do soro fetal bovino (SFB) no cultivo *in vitro* (CIV) com concentração constante de albumina sérica bovina (BSA), Complexos *cumulus*-oócitos imaturos (COC) de qualidade I, II e III obtidos de fêmeas *Bos taurus indicus* de programas comerciais de OPU (aspiração folicular) foram distribuídos em grupos de acordo com seu número e qualidade, compondo dois experimentos. A maturação *in vitro* (MIV) foi conduzida em TCM-199 modificado com FSH, LH, estradiol, EGF, insulina e 10% de SFB, por 24h a 39°C, em estufa com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. A fecundação *in vitro* (FIV) foi realizada em meio Fert-TALP acrescido de PHE e heparina, nas mesmas condições de temperatura e atmosfera da MIV, por 18 a 22h. O sêmen foi selecionado em gradientes de Percoll (90, 60 e 30%) e para inseminação (D0) utilizou-se 2x10⁶ espermatozóides/mL. O cultivo dos zigotos foi efetuado em estufa com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂ a 39°C e umidade saturada, por 6 dias, em meio SOFaaci. No primeiro experimento, o meio de cultivo foi suplementado com 4mg/mL de BSA (grupo **BSA**) ou 4mg/mL de BSA + 2% SFB (grupo **BSA+SFB**). No segundo experimento, comparou-se os grupos BSA e BSA+SFB com um grupo, cujos embriões foram cultivados com 4mg/mL de BSA e acrescido de 2% SFB a partir do quarto dia de cultivo (grupo **BSA+SFB D4**). As avaliações foram realizadas no D2 (clivagem) e D7 (blastocistos e qualidade) após a FIV. Os embriões de qualidade I foram transferidos para receptoras sincronizadas e o diagnóstico de gestação realizado após 60 dias. Os percentuais de clivagem e embriões foram submetidos à análise de variância e a taxa de prenhez foi comparada pelo Qui-Quadrado, ao nível de 5% de significância. Em ambos os experimentos, não houve diferença na taxa de clivagem. No experimento 1, a taxa de blastocistos (51%) e de blastocistos qualidade I (41%) em D7 no grupo BSA+SFB foi superior ao grupo BSA (42% e 30%, respectivamente). A taxa de prenhez dos embriões transferidos não diferiu entre os grupos (41%), no entanto em

relação aos COC maturados a taxa foi superior para o grupo BSA+SFB (16%) comparado ao grupo BSA (12%). No segundo experimento, a taxa de blastocistos em D7 no grupo BSA+SFB (47%) foi superior aos grupos BSA (34%) e BSA+SFBD4 (43%). A taxa de blastocistos qualidade I foi superior com uso de BSA+SFB (34%) e de BSA+SFBD4 (32%) em comparação ao uso somente de BSA (20%). Independente da fonte protéica utilizada no cultivo dos embriões, a taxa de prenhez não diferiu em relação ao total de COC maturados e embriões transferidos. O uso de SFB no meio SOFaaci aumenta a produção e a qualidade de blastocistos. Considerando o total de COC maturados, o uso de SFB no meio de cultivo SOFaaci aumenta o rendimento de prenhez nos programas de PIV.

Palavras-chave: cultivo *in vitro*, soro fetal bovino, BSA, fonte protéica, OPU.

Abstract

In order to evaluate the effect of fetal calf serum (FCS) on the *in vitro* culture (IVC) with fixed BSA concentration, *Cumulus*-oocyte complexes (COC) recovered by OPU from pure breed *Bos taurus indicus* donors of commercial programs were randomly assigned in two experiments according their number and quality. The *in vitro* maturation (IVM) was performed in TCM-199 with hormones and FCS. The *in vitro* fertilization (IVF) was performed in Fert-TALP medium with heparin and PHE using Percoll gradient selected spermatozoa from *Bos taurus indicus* bull. During IVM and IVF, the oocytes were incubated in 5% CO₂ in air. Presumptive zygotes were IVC in SOFaaci with 5%CO₂, 5%O₂, 90% N₂. All steps of IVP were performed in an incubator at 39°C with saturated humidity. In experiment I (n=1745; COC), the IVM and IVF were followed by IVC in SOFaaci supplemented with 4mg/mL BSA (**BSA** group=control group) or BSA+2% FCS (**BSA+FCS**). In experiment II (n=704; COC), the culture was performed with BSA, BSA+FCS or SOFaaci+BSA added 2% FCS

(**BSA+FCSD4**) on day 4 of IVC. The cleavage, blastocyst rates and quality I blastocyst were analysed by GLM procedure. Pregnancy rates were compared by Chi-square Test with 5% of significance. In Experiment I blastocyst rates (51%) and quality I blastocysts (41%) in D7, were higher ($P<0.05$) in BSA+FCS compared to the BSA group (42 and 30%, respectively). In experiment II, blastocyst rates were higher ($P<0.05$) in BSA+FCS (47%) and similar between BSA (34%) and BSA+FCSD4 (43%) groups. Blastocyst rates quality I were higher ($P<0.05$) for groups BSA+FCS (34%) and BSA+FCSD4 (32%), compared to the BSA group (20%). Pregnancy rates of the transferred embryos ($n=820$) were similar between treatments in both experiments. The pregnancy rates corresponding only the *in vitro* matured COC ($n=1651$, experiment I) were higher ($P<0.05$) for the BSA+FCS group (16%) than the BSA group (12%). IVC of bovine embryos in SOFaa+BSA+FCS increased blastocyst quality and pregnancy rates. Related the total number of matured *Cumulus*-oocyte complexes the addition of BSA+FCS to the SOFaa increased the pregnancy rates in IVP programs.

Keywords: *in vitro* culture, fetal calf serum, bovine albumin, protein source, OPU.

Introdução

Os meios definidos são essenciais para se conhecer as exigências dos embriões durante o cultivo *in vitro* (CIV). Até o momento, o desenvolvimento embrionário nesses sistemas são inferiores aos que utilizam proteínas ou mesmo células somáticas [1-4]. Sabe-se que a qualidade do oócito influencia diretamente no desenvolvimento

embrionário, enquanto que o CIV é responsável pela qualidade dos embriões [5].

Usualmente são utilizados como fonte protéica no CIV, o Soro Fetal Bovino (SFB) ou a Albumina Sérica Bovina (BSA). Muitos trabalhos têm demonstrado o efeito positivo destas substâncias no desenvolvimento embrionário [1,6-8], entretanto, podem ser substituídas por soro sintético ou macromoléculas sem atividade biológica, como o álcool polivinílico (PVA), o que possibilita uma composição definida ao meio [9]. Algumas formulações dos meios de CIV associam o BSA ao SFB [9,10].

O soro possui uma mistura de proteínas, fatores de crescimento e hormônios não totalmente identificados. Seu uso em rotinas de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos aumenta consideravelmente a produção de blastocistos [1,2,7,11], apesar de apresentar efeitos negativos na qualidade dos embriões PIV [12,13]. A concentração preconizada varia conforme o sistema de CIV utilizado [7]. O soro possui um efeito bifásico sobre o desenvolvimento embrionário [14,15], sendo sua ação sobre os estágios iniciais restrita, porém, aumentando o desenvolvimento de mórulas até blastocisto, além de aumentar o número de células, e estimular a eclosão dos blastocistos [4,16–18].

A utilização da BSA tem resultado em bons índices de desenvolvimento embrionário [1,8,13] na produção *in vitro*. Também existem variações nas concentrações dos seus constituintes como substratos energéticos e fatores de crescimento, conforme os lotes

analisados [16,19], o que torna as propriedades embriotróficas da BSA variáveis entre partidas [20].

Holm *et al.* (1999) [1] ao conduzir o CIV em meios totalmente definidos, produziram embriões que resultaram em prenhez, porém constataram a necessidade do soro ou da albumina sérica bovina na maturação *in vitro* (MIV) e/ou na fecundação *in vitro* (FIV) para não reduzir as taxas de desenvolvimento embrionário. Quando se utiliza somente BSA como fonte protéica, o desenvolvimento embrionário ocorre de forma mais lenta e a eclosão é tardia, quando comparado aos embriões PIV na presença de soro [11,21,22]. Algumas equipes já incluíram BSA ou o soro somente em determinados estágios do CIV [4,15,18,23], no entanto a maioria destas pesquisas não foram desenvolvidas com Complexos *cumulus*-oócitos (COC) recuperados por aspiração folicular (OPU).

A redução da concentração de soro durante as diferentes fases da PIV é necessária para obter embriões de melhor qualidade. Porém, até o presente momento, seu uso parece ser essencial para alcançar melhor produção embrionária. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de 2% de SFB durante todo o período de CIV ou seu acréscimo somente no quarto dia do cultivo, em sistema de CIV com concentração constante de BSA (4mg/mL) sobre o desenvolvimento e viabilidade embrionária.

Material e Métodos

Coleta dos Complexos *cumulus*-oócitos (COC)

Os COC foram obtidos por *ovum pick-up* (OPU) de vacas das raças nelore, nelore mocho, brahman e gir leiteiro, cíclicas, doadoras de embriões, com idade entre 30 e 120 meses, mantidas em pastagem de *Brachiarias sp.*, durante os meses de novembro 2004 a abril 2005 na região de Uberaba, Brasil.

Cada doadora foi submetida ao máximo duas sessões de OPU com aparelho de ultra-som Aloka SSD-500 e com transdutor setorial de 5 MHz (UST 9111), acoplado à guia transvaginal. A aspiração dos folículos foi realizada com agulha 18G (Cook-VOPAL 1855), conectada à linha de aspiração (Cook-VOPAL 1800) e bomba de vácuo (Cook-VMAR 500), com vazão de 15mL de meio por minuto. Os COC foram recuperados em tubos de 45mL em solução salina fosfatada (PBS) com 1% de SFB e 5UI de Heparina/mL. O conteúdo foi submetido à lavagem no meio de coleta, filtragem, identificação e classificação dos COC sob estereomicroscópio. Os COC de qualidade I, II e III, segundo os critérios descritos por De Loos *et al.* (1989) [24] foram considerados viáveis. Oócitos desnudos, degenerados e expandidos foram descartados. Exceto onde indicado, os demais componentes químicos foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Maturation *in vitro*

A maturação foi conduzida in grupos de 10-20 COC, in 100µL de TCM-199 modificado com 10% de SFB (Cultilab Materiais de Cultivo Celular Ltda. Rua Maria Monteiro, 177 Cambuí 13.025-150 Campinas, SP, Brasil), 5µg/mL de FSH, 50µg/mL de LH, 1µg/mL de estradiol, 100µg/mL de EGF, 6.25µg/mL de Insulin, 22µg/mL de piruvato e gentamicina. COC foram maturados por 24h em estufa de cultivo celular a 39°C em atmosfera gasosa com 5% de CO₂ em ar com umidade saturada.

Fecundação *in vitro*

Decorrido o período de maturação *in vitro*, os COC foram transferidos para gotas com 100µL de meio Fert [25], acrescido de 22µg/mL de piruvato, 6mg/mL de BSA, 10µg/mL de heparina, 20µM de penicilamina, 10µM de hipotaurina e 2µM de epinefrina. Para a fecundação foi utilizado sêmen congelado de touros *Bos taurus indicus* selecionados por gradientes de 90, 60 e 30% de Percoll. A dose inseminante foi de 2×10^6 espermatozóides/mL. O dia da fecundação *in vitro* foi considerado dia zero (D0) e o co-cultivo dos COC e espermatozóides foi conduzido por 18 a 24 horas a 39°C, umidade saturada e atmosfera gasosa de 5% de CO₂ em ar.

Cultivo *in vitro*

Após o período de fecundação, os prováveis zigotos foram submetidos a sucessivas pipetagens para retirada das células do *Cumulus oophorus*. O CIV foi realizado em 100 μ L de meio SOFaaci [1], por 6 dias, em estufa a 39°C, umidade saturada e atmosfera gasosa com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂.

Desenho Experimental

No experimento I, os COC foram distribuídos em dois grupos, sendo um em meio SOFaaci acrescido de 4mg/mL de albumina sérica bovina (grupo BSA=Controle) e outro em 4mg/mL de BSA + 2% de soro fetal bovino (grupo BSA+SFB). Neste experimento foram realizadas 50 sessões de OPU/IVP em 22 dias, sendo coletados 1745 COC viáveis para MIV.

No experimento II, os oócitos foram cultivados em meio SOFaaci acrescido de 4mg/mL de BSA (grupo BSA=Controle) ou em 4mg/mL de BSA + 2% de SFB desde o início do cultivo (grupo BSA+SFB), ou ainda em 4mg/mL de BSA desde o início do CIV acrescido de 2% de SFB a partir do quarto dia de IVC (grupo BSA+SFBD4). Durante 9 dias foram realizadas 12 sessões de OPU/PIV, obtendo-se 704 COC viáveis.

Em ambos os experimentos, os COC de cada doadora foram distribuídos de forma homogênea, quanto ao número e a qualidade entre

os grupos, para evitar a influência da doadora sobre o resultado entre os grupos.

Avaliação e transferência dos embriões

As avaliações de clivagem e embriões em D7 (blastocistos e qualidade dos blastocistos) foram realizadas no segundo e sétimo dias após a FIV, respectivamente. Os embriões destinados à transferência para receptoras foram avaliados morfológicamente no dia 7 [26]. O envase foi efetuado em palhetas de 0.25mL em meio TCM-Hepes com 10% SFB. As palhetas foram transportadas em caixas térmicas à temperatura de 25 a 30°C. A transferência dos embriões foi efetuada em até 8 horas após o envase, via transcervical, para receptoras sincronizadas. O diagnóstico de gestação foi realizado 60 dias após a inovulação, por exame retal e confirmado por ultra-sonografia. Avaliou-se o índice de prenhez em relação ao número de embriões transferidos e em relação ao total de COC viáveis colocados para maturar.

Análise estatística

Os percentuais de clivagem, embriões em D7 e embriões de qualidade I em D7 foram analisados pelo procedimento GLM do SAS (1998) [27] após terem sido submetidos à transformação arcoseno raiz quadrada. No modelo de análise foi mantido o efeito da doadora por ter sido significativo. A taxa de prenhez, referente ao número de embriões

transferidos ou ao número de COC maturados *in vitro* foi comparada pelo teste do Qui-quadrado. Em todas as análises foi considerado o nível de 5% de significância.

Resultados

Experimento I

A taxa de clivagem não diferiu ($P>0.05$) entre os grupos BSA, BSA+SFB (Tabela 1). A produção de blastocistos em D7 e a proporção de blastocistos de qualidade I do grupo BSA+SFB foi superior ($P<0.05$) ao grupo BSA.

Tabela 1. Efeito da fonte protéica no meio sintético de oviduto (SOFaaci) modificado sobre a clivagem, desenvolvimento embrionário e qualidade de blastocistos de vacas *Bos taurus indicus* de programas comerciais de OPU/PIV.

Fonte proteica em SOFaaci	Complexos cumulus-oócitos n	Clivagem %	Blastocistos D7 %	Blastocistos D7 qualidade I %
4mg/mLBSA+2%SFB	834	72.9 ^a	51.5 ^b	41.2 ^b
4mg/mL BSA (controle)	911	73.4 ^a	41.7 ^a	30.0 ^a

^{a,b} na mesma coluna diferem significativamente ($P<0.05$).

A transferência de 605 embriões PIV para receptoras resultou no índice médio de 41% de prenhez aos 60 dias (Fig. 1), não havendo diferença entre a fonte protéica utilizada no cultivo embrionário.

No entanto, o índice de prenhez considerando os COC maturados foi superior ($P<0.05$) para o grupo BSA+SFB (16.0%) comparado com grupo de embriões cultivados somente com BSA (12.5%; Fig. 1).

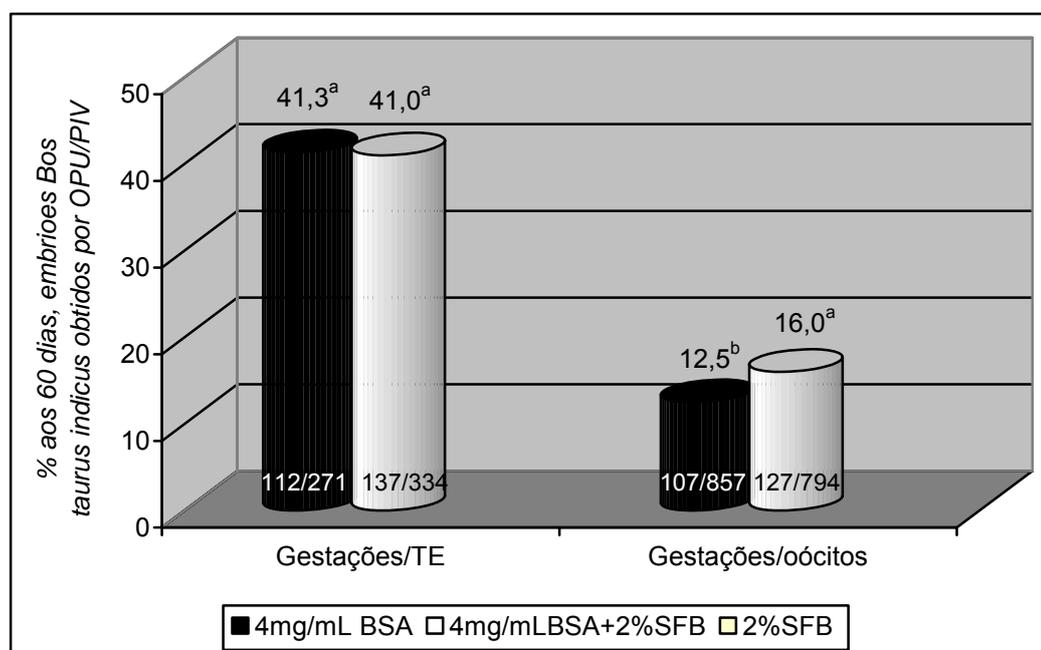


Figura 1. Taxa de prenhez sobre o total de complexos *cumulus*-oócitos maturados obtidos por OPU de *Bos taurus indicus* (raças nelore, nelore mocho, brahman e gir leiteiro) e cultivados *in vitro* com 4mg/mL de BSA + 2% de soro fetal bovino (SFB) ou 4mg/mL de albumina sérica bovina (BSA=Controle) ($P<0.05$).

Experimento II

A taxa média de clivagem dos oócitos foi de 75%, sendo similar entre os tratamentos BSA, BSA+SFB e BSA+SFBD4. Conforme mostra a Tabela 2, a produção de blastocistos em D7 dos embriões cultivados em meio SOFaaci suplementado com BSA+SFB foi superior ($P<0.05$) em relação aos embriões cultivados somente com BSA e semelhante ao grupo suplementado com BSA+SFB no D4 (47.2%; 34.7% e 43.1%, respectivamente). Porém, a taxa de blastocistos qualidade I em D7 seja com BSA+SFB (34.0%), ou BSA+SFBD4 (32.2%) foi superior ($P<0.05$) aos embriões cultivados somente com BSA (19.9%).

Tabela 2. Taxa de clivagem, desenvolvimento e qualidade embrionária ao sétimo dia (D7) de cultivo *in vitro* (CIV) em SOFaaci+4mg/mL de albumina sérica bovina (BSA)+2% de soro fetal bovino (BSA+SFB), 4mg/mL de BSA+2% de SFB no quarto dia de CIV (BSA+SFBD4) ou 4mg/mL de BSA.

Fonte protéica em SOFaaci modificado	Complexos <i>cumulus</i> -oócitos n	Clivagem %	Blastocistos D7 %	Blastocistos D7 qualidade I %
BSA+SFB	255	75.8 ^a	47.2 ^b	34.0 ^b
BSA+SFBD4	210	75.3 ^a	43.1 ^{ab}	32.2 ^b
BSA (controle)	239	76.0 ^a	34.7 ^a	19.9 ^a

^{a,b} na mesma coluna indicam diferença significativa ($P<0.05$).

A transferência de 215 embriões não resultou em diferença em relação ao total de embriões transferidos (qualidade I) nem em relação ao total de COC maturados *in vitro*, conforme mostra a Tabela 3 ($P>0.05$).

Tabela 3. Taxa de prenhez sobre o total de complexos *cumulus*-oócitos bovinos maturados e sobre total de embriões transferidos cujo cultivo *in vitro* em SOFaaci foi suplementado com 4mg/mL de BSA+2% de SFB (BSA+SFB), 4mg/mL de BSA+2% de SFB no quarto dia de cultivo (BSA+SFB4), ou somente com 4mg/mL de BSA (BSA).

Fonte protéica em	Gestações/TE	Gestações /COC
SOFaaci modificado	n (%)	n (%)
BSA+SFB	27/93 (29.0) ^a	17/255 (10.6) ^a
BSA+SFB4	17/72 (23.6) ^a	17/210 (8.1) ^a
BSA (controle)	15/50 (30.0) ^a	15/239 (6.3) ^a

($P>0.05$)

DISCUSSÃO

A qualidade dos blastocistos PIV é inferior àquela dos blastocistos obtidos *in vivo*, o que diminui os índices finais de prenhez, além de diminuir a resistência a criopreservação. O tipo de cultivo pós-fecundação influencia a qualidade dos embriões produzidos [5]. Embriões bovinos podem ser cultivados em condições definidas, no entanto a

suplementação protéica promove efeitos benéficos que se refletem no desenvolvimento embrionário [6]. Nos dois experimentos do presente trabalho, a adição de 2% de SFB resultou em maior eficiência na PIV de embriões, pelo aumento da produção de blastocistos em comparação ao cultivo efetuado somente na presença de BSA. Outras pesquisas têm demonstrado que o cultivo com soro aumenta a produção de blastocistos independente da fase na qual o mesmo é adicionado [1–4].

Embora o soro possa apresentar efeitos negativos na qualidade dos embriões obtidos *in vitro* [7,11,28] no presente estudo constatou-se produção superior de no mínimo 10% de embriões de qualidade I quando o cultivo foi efetuado na sua presença, em comparação ao uso isolado de BSA. É possível que a baixa concentração de soro utilizada (2%), ou sua associação com BSA (4mg/mL), possam ter diminuído ou neutralizado sua influência negativa sobre a qualidade dos embriões. A ação neutralizante promovida por essa associação sobre agentes tóxicos já foi comprovada anteriormente [9,10, 12].

Para conhecer e estabelecer as necessidades metabólicas de gametas e embriões, o uso de meios quimicamente definidos é fundamental, porém quando se busca a máxima produtividade do sistema, a adição de fontes protéicas nos meios de CIV é essencial [1,7]. Nesta pesquisa, ao comparar o CIV com meio suplementado com BSA, a adição de 2% de SFB resultou em maior desenvolvimento embrionário, sem que a qualidade dos mesmos e a taxa de prenhez tenham sido afetadas,

corroborando com os dados de Pinyopummintr & Bavister (1994) [4], Krisher *et al.* (1999) [17] e Gordon (2003) [7] que evidenciaram taxas de desenvolvimento de embriões inferiores com o cultivo realizado em meios livres de proteínas. O uso de SFB pode ter importante repercussão nos programas de OPU/PIV em bovinos, quando o objetivo é aumentar a produtividade de bezerros resultantes desta biotecnologia. Entretanto, é necessário lembrar que o soro é suspeito de contribuir para a síndrome do bezerro gigante (“large offsprings syndrome”) [7,11], o que pode diminuir o número de produtos nascidos saudáveis, em sistemas que utilizam a adição de soro ao meio de cultivo *in vitro*.

Ao avaliar a produção de blastocistos bovinos em meio SOF acrescido de BSA, BSA+SFB ou *in vivo* no oviduto de ovelhas, Lonergan *et al.* (2004) [28] demonstraram pioneiramente que o tipo de cultivo *in vitro* pode aumentar a incidência de anormalidades cromossômicas. Em 80% dos embriões produzidos em SOF+10%SFB foi identificado mais de um tipo de anormalidade, indicando que não somente o meio de cultivo *in vitro*, como também a velocidade de desenvolvimento é importante na incidência e severidade de alterações cromossômicas. O aparente efeito negativo do soro pode ser atribuído à acelerada evolução embrionária que não permite tempo suficiente para ocorrência da cariocinese fisiológica. A maior presença de anormalidades cromossômicas [28] e a menor resistência à criopreservação [3] têm sido constatadas em embriões cultivados em meio contendo soro em comparação ao uso isolado de

BSA. Por outro lado, já foi demonstrado maior número de células e maior taxa de eclosão na produção *in vitro* cujo meio de cultivo continha soro [16], o que poderia resultar em maior taxa de prenhez após a transferência dos embriões. As pesquisas que relatam efeitos negativos do soro sobre a viabilidade embrionária, a concentração de soro preconizada foi de até 20% [3,28], sendo muito superior aos 2% utilizados no presente trabalho. Na maioria destas pesquisas, o soro não foi utilizado em associação com BSA, o que poderia explicar o fato de não ter havido efeito negativo da presença de soro sobre a taxa de prenhez em nosso trabalho. Outro fator importante a se considerar é que os dados de pesquisas de OPU/PIV em *Bos taurus indicus* que avaliaram o efeito do soro x BSA no cultivo *in vitro* são escassos e o conhecimento existente se restringe ao processo de produção *in vitro* com oócitos de vacas provenientes de frigorífico.

O efeito bifásico do soro no CIV de embriões bovinos já foi demonstrado em diferentes estudos [14–16]. No entanto, os resultados do nosso trabalho foram divergentes na produção total de blastocistos e na qualidade embrionária em D7. Apesar da exposição prolongada ao soro provocar alterações morfológicas e bioquímicas nos embriões [16,29], não se verificou diferença quando o mesmo foi introduzido desde o início do cultivo ou somente a partir do quarto dia de CIV, pois não foi constatada diferença na PIV, qualidade dos embriões e taxa de prenhez nos dois sistemas. É possível que a concentração de 2% de soro e sua associação

com BSA possa explicar a ausência do efeito bifásico do soro sobre o desenvolvimento e qualidade dos embriões. Ambos os procedimentos podem apresentar vantagens, pois a utilização de soro desde o início do CIV elimina a necessidade de manipular os embriões durante seu desenvolvimento com a troca de meio ou adição de SFB, por outro lado a sua utilização a partir do quarto dia de CIV diminui o tempo de exposição dos embriões ao soro.

A taxa de prenhez não diferiu entre os tratamentos em relação aos embriões transferidos nos dois experimentos ($P>0.05$), no entanto, no experimento I a taxa de prenhez sobre os COC MIV foi superior quando o cultivo foi conduzido com BSA+SFB (16%) em relação ao grupo BSA (12%; Fig. 1). No experimento II, nesta mesma avaliação, não se constatou diferença, porém há uma tendência do cultivo com soro (BSA+SFB e BSA+SFB_{D4}) ser superior ao cultivo BSA (10.6%; 8.1% e 6.3%, respectivamente).

A adição de 2% de SFB ao meio de cultivo *in vitro* SOFaaci aumenta a produção de blastocistos em D7 e a taxa de blastocistos qualidade I. Não há diferença na taxa de prenhez de embriões produzidos em meio de cultivo com 0,4% de BSA ou 0,4% de BSA + 2% de SFB, no entanto o uso de 2% de SFB aumenta a eficiência da PIV de embriões bovinos, por aumentar a porcentagem de prenhez produzida em relação ao total de COC maturados. Este fato torna a inclusão do soro no meio de cultivo essencial para otimização dos resultados de PIV.

Referências

- [1] HOLM P, BOOTH PJ, SCHMIDT MH, GREVE T, CALLESEN H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaaci medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. *Theriogenology* 1999;52:683-700.
- [2] KESKINTEPE L, BRACKETT BG. *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. *Biol of Reprod* 1996;55:333-339.
- [3] MUCCI N, ALLER J, KAISER GG, HOZBOR F, CABODEVILA J, ALBERIO RH. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 2006;65:1551-1562.
- [4] PINYOPUMMINTR T, BAVISTER BD. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: Effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology* 1994;41:1241-1249.
- [5] RIZOS D, LONERGAN P, BOLAND MP, GARCIA RA, PINTADO BF, GUTIERREZ AA. Analysis of differential mRNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocysts quality. *Biol of Reprod* 2002;66:589-595.
- [6] CAROLAN C, LONERGAN P, VAN LANGENDOCKT A, MERMILLOD P. Factors affecting bovine embryos development in synthetic oviduct fluid

following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. Theriogenology 1995;43:1115-1128.

[7] GORDON I. Laboratory Production of Cattle Embryo, 2nd Edition. 2003, CAB International, University Press, Cambridge, 548p.

[8] LAZZARI G, DUCHI R, CROTTI G, TURINI P, NOTARI C, GALLI C. Effect of *in vitro* culture in SOF-BSA versus SOF-serum on the development of IVM-IVF bovine embryos up to day 12. In: Proc 16th Meeting AETE 2000;176 [Abstract].

[9] DUQUE P, HIDALGO CO, GOMEZ E, PINTADO B, FACAL N, DIEZ C. Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water source: effects on bovine *in vitro* embryo development and quality. Reprod Nut and Dev 2003;43:487-496.

[10] FLOOD LP, SHIRLEY B. Reduction of embriotoxic by protein in embryo culture media. Mol Reprod Dev 1991;30:226-231.

[11] THOMPSON JG, ALLEN N, MCGOWAN LT, BELL ACS, LAMBERT MG, TERVIT HR. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development *in vitro* and following transfer. Theriogenology 1998;49:1239-1249.

[12] GOMEZ E, DIEZ C. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. Anim Reprod Sci 2000;58:23-37.

[13] RIZOS D, GUTIÉRREZ AA, GARNELO SP, FUENTE J, LONERGAN P, BOLAND MP. Bovine embryo culture in the presence or absence of

serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance and messenger RNA expression. *Biol of Reprod* 2003;68:236-243.

[14] BAVISTER BD, HELLEKANT TAR, PINYOPOMMINTR T. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocyst in defined culture media. *Theriogenology* 1992;37:146 [Abstract].

[15] PINYOPUMMINTR T, BAVISTER BD. *In vitro* matured/fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biol of Reprod* 1991;45:736-742.

[16] BAVISTER BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1995;1(2):91-148.

[17] KRISHER RL, LANE M, BAVISTER BD. Developmental Competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biol of Reprod* 1999;60:1345-1352.

[18] LIM K, LEE B, KANG S, HWANG H. Effects of protein source and energy substrates on the *in vitro* development of bovine embryos in a two-step culture system. *J Vet Sci* 2003;41(1):73-78.

[19] RORIE RW, MILLER GF, NASTI KB, MCNEW RW. *In vitro* development of bovine embryos as affected by different lots of bovine serum albumin and citrate. *Theriogenology* 1994;42:397-403.

[20] DOBRINSKY JR, JOHNSON LA, RATH D. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: Effects of bovine serum albumin

and fetal bovine serum on embryo development. Biol of Reprod 1996;55:1067-1074.

[21] NEDANDABLE TL, GROEN W, YANG X. Comparison between KSOM and SOFaaci for *in vitro* produced bovine embryos. Theriogenology 2002;57:523 [Abstract].

[22] WESTBERG SA, MONSON RL, RUTLEDGE JJ. Higher hatching rates obtained with BSA supplementation compared with FCS in KSOM medium. Theriogenology 2002;57:530 [Abstract].

[23] LIU Z, FOOTE RH. Effects of amino acids on the development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilization bovine embryos in a simple protein-free medium. Human Reprod 1995;10:2985-2991.

[24] DE LOOS F, VAN VLIET C, VAN MAURIK P, KRUIP TA. Morphology of immature bovine oocytes. Gamete Res 1989;24:197-204.

[25] PARRISH JJ, SUSKHO-PARRISH JL, LEIBRIFRIED-RUTLEDGE ML, CRITSER ES, EYESTONE WH, FIRST NL. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology 1986;25:591-600.

[26] IETS. Manual of International Embryo Transfer Society. Ed. Stringfellow DA & Seidel SM, 3^a edition, 1998, p.167-170, Appendix D.

[27] SAS user's guide: statistical analysis system. 1998. Version 6.2:1998, Cary, NC: SAS Institute. 846p.

[28] LONERGAN P, PEDERSEN HG, RIZOS D, GREVE T, THOMSEN PD, FAIR T, EVANS A, BOLAND MP. Effect of the post-fertilization culture

environment on the incidence of chromosome aberrations on bovine blastocysts. Biol of Reprod 2004;71:1096-1100.

[29] ZHANG L, DENNISTON RS, GODKE RA. A simple method for *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and co-culture of bovine oocytes. J Tissue Culture Method 1992;14:107-112.

4. Discussão Geral

A tecnologia de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos está em constante desenvolvimento e nos últimos anos alcançou resultados mais estáveis que possibilitaram sua aplicação comercial. Neste setor, ganharam grande destaque as raças zebuínas, que por apresentarem maior oferta de oócitos comparada aos *Bos taurus taurus*, produzem em média duas prenhez por sessão de OPU-PIV. No entanto, estes resultados são influenciados diretamente pelas características individuais da doadora, bem como pelo sêmen e pelo protocolo utilizado em todas as etapas da PIV.

Diferenças nos protocolos e sistemas de PIV de embriões bovinos, incluindo atmosfera gasosa, meios de cultivo e suplementação protéica utilizados nas diferentes etapas da PIV, podem influenciar diretamente os resultados finais de desenvolvimento, qualidade embrionária e taxa de gestação. A otimização destes protocolos e sistemas é fundamental em programas comerciais de OPU/PIV, visto que neste caso algumas variáveis como qualidade dos oócitos, número de estruturas por volume de meio e acasalamento não podem ser controladas adequadamente, como acontece nas pesquisas desenvolvidas com oócitos de ovários bovinos provenientes de matadouro.

Atualmente, a atmosfera gasosa utilizada durante a maturação e a fecundação *in vitro* é de 5% de CO₂ em ar, para que em combinação com o bicarbonato de sódio, haja manutenção adequada do pH dos meios, não sendo controlada a concentração de oxigênio nestas fases. No entanto, alguns autores sugerem o controle do O₂ na MIV e FIV, no intuito de reduzir o estresse oxidativo e conseqüentemente melhorar a qualidade dos embriões produzidos (UMAOKA et al., 1992; ALLI et al., 2003; OYAMADA & FUKUI, 2004). Em nosso primeiro experimento (Capítulo 1)

quando a MIV e FIV dos COC foram conduzidas sob atmosfera de 5% de O₂, não houve interferência negativa na taxa de clivagem, bem como na produção e qualidade dos blastocistos de D7. É importante ressaltar que o uso de 5% de oxigênio durante a FIV não foi avaliada separadamente da MIV. No entanto, alguns pesquisadores já utilizaram com sucesso 5% de O₂ com sêmen de touros com baixo desempenho em protocolos convencionais (20% de oxigênio). Esta pode ser uma ferramenta para se atingir uma maior produção (TAKAHASHI & KANAGAWA, 1998; LAZZARI et al., 1998; GALLI et al., 2001).

No que se refere à viabilidade dos embriões produzidos em diferentes sistemas, em nosso trabalho (Capítulo 1), não houve diferença na taxa de prenhez, no entanto a maior taxa de eclosão foi obtida com concentração reduzida de O₂ (5%) durante a MIV e FIV. Esta maior eclosão pode ser indicativa de desenvolvimento mais rápido de embriões produzidos em sistema totalmente sob a atmosfera de 5% de O₂. Estes resultados poderão ter importante aplicação no congelamento, visto que os embriões com desenvolvimento precoce apresentam maior resistência a criopreservação (De MATOS et al., 1996). É importante ressaltar que a presente pesquisa foi desenvolvida com doadoras de embriões em programas comerciais, sob condições limitadas no que se refere ao número de complexos *cumulus*-oócitos e volume de meio, fundamentais quando se determina a concentração de oxigênio.

A suplementação com proteínas, como soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA) ao meio de CIV, evidencia benefícios para o desenvolvimento embrionário (CAROLAN et al., 1995). Meios definidos, sem suplementação protéica ou de células somáticas são essenciais para se determinar as necessidades específicas dos zigotos e embriões. No entanto, até o momento os índices de desenvolvimento embrionário e prenhez nesses sistemas são inferiores aos que utilizam SFB ou BSA. A remoção do soro e das células somáticas e sua substituição pela BSA como fonte protéica tem resultado em bons índices de desenvolvimento

embrionário (HOLM et al., 1999; LAZZARI et al., 2000; RIZOS et al., 2003). Outros estudos têm incluído a BSA ou o soro somente em determinados estágios do CIV (PINYOPUMMINTR & BAVISTER, 1991; LIU & FOOTE, 1995; LIM et al., 2003).

No segundo experimento (Capítulo 2), a produção embrionária sempre foi superior quando o meio SOFaaci+BSA foi suplementado com 2% de SFB, quando comparado aos embriões cultivados com SOFaaci+BSA, confirmando os efeitos benéficos do soro no meio de cultivo durante a produção *in vitro* de embriões. Sabe-se que além de aumentar a variabilidade na produção, devido as diferentes composições, o soro, ainda está relacionado à baixa qualidade de embriões. No entanto, em nossos experimentos a produção de embriões foi 10% superior quando se adicionou 2% de SFB ao meio de CIV com 4mg/mL de BSA, sem perda na qualidade morfológica ou taxa de prenhez (Capítulo 2). Estes resultados podem estar associados à reduzida concentração de soro (2%) preconizada em nossa pesquisa, visto que a literatura (GORDON, 2003) menciona o uso de até 20% de SFB no meio de CIV. A associação do soro fetal bovino com a BSA também pode ter influenciado os resultados da nossa pesquisa, pois o efeito neutralizante dos agentes tóxicos quando se utiliza esta associação já foi relatado (FLOOD & SHIRLEY, 1991; DUQUE et al., 2003).

No segundo experimento do capítulo 2, novamente verificou-se resultados superiores de PIV quando os embriões foram cultivados com soro, em comparação aos cultivados em BSA. Ao avaliar o momento da inclusão do soro no cultivo, não houve diferença na PIV e taxa de prenhez quando adicionado a partir do quarto dia ou desde o início. A concentração de soro utilizada em nossos experimentos (2%), bem como a associação com a BSA (4mg/mL), pode ter sido responsável por estes resultados. Sabendo que a exposição prolongada ao soro provoca alterações morfológicas e bioquímicas nos embriões (ZHANG et al., 1992; BAVISTER, 1995), parece ser melhor utilizá-lo a partir do quarto dia de

CIV, mesmo não tendo sido constatada diferenças na PIV, qualidade dos embriões e taxa de prenhez nos dois sistemas desenvolvidos na presente pesquisa.

O somatório de pequenos incrementos são de grande importância nos resultados finais da PIV de embriões, pois resultam em embriões de melhor qualidade, e conseqüentemente maior número de gestações a partir do total de COC maturados. A literatura enfatiza diferenças entre embriões obtidos *in vivo* e *in vitro*, tais como as metabólicas (KHURANA & NIEMANN, 2000), a sensibilidade à criopreservação (GORDON, 2003) e a viabilidade pós transferência para receptoras (MERTON et al., 2003). Estas diferenças estão sempre relacionadas às condições que os oócitos e embriões são submetidos durante as fases de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. Nestes trabalhos são citadas como alternativas para minimizar tais diferenças, a redução do estresse oxidativo e a eliminação ou redução da concentração de soro durante as fases da PIV. Em nossos experimentos, a redução da concentração de oxigênio de 20 para 5% durante todas as fases da PIV mostrou-se viável, podendo ser uma alternativa para uso em programas de OPU/PIV. Já quando se preconizou o uso do SFB, houve otimização dos resultados de produção de embriões e nas taxa de gestações. Apesar de não ter sido possível a retirada total do soro durante o CIV, obteve-se resultados satisfatórios com apenas 2% de SFB. Este fato poderá ter importante repercussão nos programas de OPU/PIV em bovinos, quando o objetivo é aumentar a produtividade de bezerros resultantes desta biotecnologia.

5. CONCLUSÕES

- 1- A maturação e fecundação *in vitro* de complexos *cumulus*-oócitos *Bos taurus indicus* obtidos por OPU sob atmosfera de 5% de oxigênio é viável e não compromete o desenvolvimento embrionário.
- 2- A qualidade dos embriões produzidos e da taxa de prenhez dos blastocistos qualidade I não são afetadas quando a MIV e a FIV dos complexos *cumulus*-oócitos *Bos taurus indicus* obtidos por OPU são conduzidas sob atmosfera de 5% de oxigênio.
- 3- A eclosão dos embriões produzidos com complexos *cumulus*-oócitos *Bos taurus indicus* coletados por OPU, é superior quando a MIV e a FIV são conduzidas em atmosfera com 5% de O₂
- 4- A adição de 2% de soro fetal bovino no meio de CIV aumenta a produção de blastocistos sem afetar a qualidade morfológica.
- 5- A produção *in vitro* de embriões *Bos taurus indicus* e a taxa de prenhez são similares com a adição de 2% de soro fetal bovino ao meio SOFaaci desde o início do cultivo ou a partir do quarto dia de cultivo *in vitro*.
- 6- O uso de 2% de soro fetal bovino no meio de cultivo *in vitro* SOFaaci aumenta a eficiência da produção *in vitro* de embriões *Bos taurus indicus*, por aumentar a taxa de prenhez em relação aos oócitos obtidos por OPU.

6. Referências Bibliográficas

ADAM, A.A.G., TAKAHASHI, Y., NAGANO, S.K.M. Effects of oxygen tension in the gas atmosphere during *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and *in vitro* culture on the efficiency of *in vitro* production of mouse embryos. **Japanese Journal Veterinary Research**, v.52, n.2, p.77-84, 2004.

ALLI, A.A., BILOUDEAU, J.F., SIRARD, M.A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v.59, p.939-949, 2003.

ARANTES, M., *et al.* Utilização de diferentes meios de cultivo para a produção *in vitro* de blastocistos bovinos em atmosfera modificada. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.222, 2003.

AZAMBUJA, R.M., MORENO, J.F., KRAEMER, D. Effect of gas atmosphere on *in vitro* maturation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.39, p.184, 1993.

BAVISTER, B.D., HELLEKANT, T.A.R., PINYOPUMMINTR, T. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocyst in defined culture media. **Theriogenology**, v.37, p.146, 1992.

BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, v.1, n.2, p.91-148, 1995.

CAIADO, V.S.D., *et al.* Influência do suplemento de macromoléculas e da atmosfera gasosa na maturação de oócitos bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.272, 2003.

CAROLAN, C., *et al.* Factors affecting bovine embryos development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, v.43, p.1115-1128, 1995.

CHIAN, R.C., NIWA, K., SIRARD, M.A. Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, v.41, p.1499-1508, 1994.

DE LOOS, F., *et al.* Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, v.24, p.197-204, 1989.

DE MATOS, D.G., *et al.* Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freeze ability. **Molecular Reproduction Development**, v.45, p.451-457, 1996.

DOBRINSKY, J.R., JOHNSON, L.A., RATH, D. Development of a culture medium (BECM-3) for porcine embryos: Effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on embryo development. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1067-1074, 1996.

DUMOULIN, J.C.M., *et al.* Effect of oxygen concentration on *in vitro* fertilization and embryo culture in the human and the mouse. **Fertility and Sterility**, v.63, p.115-119, 1995.

DUQUE, P., *et al.* Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water source: effects on bovine *in vitro* embryo development

and quality. **Reproduction Nutrition and Development**, v.43, p.487-496, 2003.

EPPIG, J.J., WIGGLESWORTH, K. Factors affecting the developmental competence of mouse oocytes grown *in vitro*: oxygen concentration. **Molecular Reproduction Development**, v.42, p.447-456, 1995.

FLOOD, L.P., SHIRLEY, B. Reduction of embryotoxic by protein in embryo culture media. **Molecular Reproduction Development**, v.30, p.226-231, 1991.

GALLI, C., *et al.* Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v.55, p.1341-1357, 2001.

GOMEZ, E., DIEZ, C. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.58, p.23-37, 2000.

GORDON, I. **Laboratory Production of Cattle Embryo**, 2nd Edition. CAB International, University Press, Cambridge, 548p, 2003.

HASHIMOTO, S., *et al.* Low oxygen tension during *in vitro* maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development**, v.57, p.353-360, 2000.

HOLM, P., *et al.* High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaaci medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. **Theriogenology**, v.52, p.683-700, 1999.

IETS. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**, Wright, J.M., 3ª edição, p.173-176, apêndice D, 1998.

IWATA, H., *et al.* Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. **Theriogenology**, v.50, p.365-375, 1998.

KESKINTEPE, L., BRAKETT, B.G. *In vitro* developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. **Biology of Reproduction**, v.55, p.333-339, 1996.

KHURANA, N.K., NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v.54, p.741-756, 2000.

KIKUCHI, K., *et al.* Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system. **Biology of Reproduction**, v.66, p. 1033-1041, 2002.

KONISHI, M., *et al.* Presence of granulosa cells during oocyte maturation improved *in vitro* development of IVM-IVF bovine oocytes that were collected by ultrasound-guide transvaginal aspiration. **Theriogenology**, v.45, p.573-581, 1996.

KRISHER, R.L., LANE, M., BAVISTER, B.D. Developmental Competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. **Biology of Reproduction**, v.60, p.1345-1352, 1999.

KRUIP, T.A.M., BEVERSE, M.M., KEMP, B. Environment of oocyte and embryo determines health of IVP offspring. **Theriogenology**, v.53, p.611-618, 2000.

LAZZARI, G., CROTTI, G.N., DUCHI, R. Lowering the oxygen level during IVF improves the fertilizing ability of bovine sperm and does not affect the developmental capacity of the embryos obtained. In: **19th Scientific Meeting A.E.T.E.** 1998, Rolduc, Anais European Embryo Transfer Association, 1998, p.198.

LAZZARI, G., *et al.* Effect of *in vitro* culture in SOF-BSA versus SOF-serum on the development of IVM-IVF bovine embryos up to day 12. In: **Proceedings 16th Meeting Association Embryo Transfer European**, Santander, 2000, p.176.

LIM, K., *et al.* Effects of protein source and energy substrates on the *in vitro* development of bovine embryos in a two-step culture system. **Journal Veterinary Science**, v.41, p.73-78, 2003.

LIU, Z., FOOTE, R.H. Effects of amino acids on the development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilization bovine embryos in a simple protein-free medium. **Human Reproduction**, v.10, p.2985-2991, 1995.

LONERGAN, P., *et al.* Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations on bovine blastocysts. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1096-1100, 2004.

MASTROIANNI, L.J., JONES, R. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.9, p.99-102, 1965.

MCNATTY, K.P. Follicular fluid. In: **The vertebrate ovary**, JONES, R.E., ed. Plenum Press, New York. 1978. pp.215-259.

MERTON, J.S., *et al.* Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v.59, p.651-674, 2003.

MUCCI, N., *et al.* Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v.65, n.8, p.1551-1562, 2006.

NEDANDABLE, T.L., GROEN, W., YANG, X. Comparison between KSOM and SOFaaci for *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.57, p.523, 2002.

OYAMADA, T., FUKUI, Y. Oxygen tension and medium supplements for *in vitro* maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. **Journal of Reproduction and Development**, v.50, p.107-117, 2004.

PARRISH, J.J., *et al.* Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v.25, p.591-600, 1986.

PINYOPUMMINTR, T., BAVISTER, B.D. *In vitro* matured/fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. **Biology of Reproduction**, v.45, p.736-742, 1991.

PINYOPUMMINTR, T., BAVISTER, B.D. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: Effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. **Theriogenology**, v.41, p.1241-1249, 1994.

PINYOPUMMINTR, T., BAVISTER, B.D. Optimum gas atmosphere for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.44, p.471-477, 1995.

RIZOS, D., *et al.* Analysis of differential mRNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocysts quality. **Biology of Reproduction**. v.66, p.589-595, 2002.

RIZOS, D., *et al.* 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.

RORIE, R.W., *et al.* *In vitro* development of bovine embryos as affected by different lots of bovine serum albumin and citrate. **Theriogenology**, v.42, p.397-403, 1994.

SAS user's guide: statistical analysis system. 1998. Version 6.2, Cary, NC: **SAS** Institute. pp.846.

SIQUEIRA-PYLES, E.S.C., PEDRAZZI, C.A.F., LANDIM-ALVARENGA, F.C. Utilização de estufa portátil (LIFE) para a produção *in vitro* de embriões bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.94, 2004. Suplemento.

TAKAHASHI, Y., KANAGAWA, H. Effect of oxygen concentration in the gas atmosphere during *in vitro* insemination of bovine oocytes on the subsequent embryonic development *in vitro*. **Japanese Vet. Med. Science**, v.60, n.3, p.365-367, 1998.

THOMPSON, J.G., *et al.* Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development *in vitro* and following transfer. **Theriogenology**, v.49, p.1239-1249, 1998.

UMAOKA, Y., *et al.* Effect of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. **Molecular Reproduction Development**, v.31, p.28-33, 1992.

WESTBERG, S.A., MONSON, R.L., RUTLEDGE, J.J. Higher hatching rates obtained with BSA supplementation compared with FCS in KSOM medium. **Theriogenology**, v.57, p.530, 2002.

ZHANG, L., DENNISTON, R.S., GODKE, R.A. A simple method for *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization and co-culture of bovine oocytes. **Journal Tissue Culture Method**, v.14, p.107-112, 1992.

7. Apêndices

Apêndice I

Resumo apresentado na XVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de
Tecnologia de Embriões (SBTE), 28 a 31 de agosto de 2003,
Beberibe, CE.

RESPOSTA DE VACAS *Bos Indicus* A ASPIRAÇÃO POR SESSÃO DE OPU E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE BLASTOCISTOS

(RESPONSE OF THE *Bos Indicus* COW TO ASPIRATION PER OPU SESSION
AND *IN VITRO* PRODUCED BLASTOCYSTS)

RESPOSTA DE VACAS *Bos Indicus* A ASPIRAÇÃO POR SESSÃO DE OPU E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE BLASTOCISTOS

Leivas, F.G.^{1*}; Brum, D.S.[†]; Rufino, F.A.³, Guimarães, A.V.⁵, Bernardi, M.L.⁴; Silva, C.A.M.²; Rubin, M.I.B.²

* Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

² Embryolab – Laboratório de Embriologia and Reprodução Animal, DCGA, CCR, Universidade Federal de Santa Maria. 97.119-900 Santa Maria, RS.

³ Mestre em Ciência Animal, UEL, Londrina, PR.

⁴ Depto. de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

⁵ Veterinário, Lins, São Paulo, SP.

Pode a seleção de doadoras resultar em uma maior produção de oócitos viáveis e de taxas de blastocistos, usando-se programas de OPU/PIV para aumentar a disseminação desta técnica? Com este propósito a quantidade de oócitos recuperados e as taxas de blastocistos durante a produção *in vitro* (PIV) de cada doadora *Bos indicus* foram analisadas. Sete vacas de 4 a 13 anos, foram submetidas a OPU uma vez por semana, por 3 a 5 semanas, totalizando 26 sessões. Uma probe transvaginal, um aparelho de ultra-som Aloka SSD-500 com transdutor setorial de 5MHz e uma agulha de aspiração de 55cm conectada a um tubo de 50 mL e a uma bomba de vácuo Cook VMAR 500 com 70mmHg, foram utilizados para aspirar o líquido folicular. Após a aspiração, o líquido foi filtrado e a procura e seleção de oócitos foram realizadas, sendo que os complexos *cumulus*-oócitos (COC) degenerados ou expandidos foram descartados. A maturação *in vitro* (MIV) foi realizada durante as primeiras 24 horas e a FIV (fecundação *in vitro*) nas 18 horas seguintes, com espermatozóide de 3 touros *Bos indicus*. O cultivo *in vitro* (CIV) foi realizado em meio SOFaaci por 7 dias em estufa de cultivo com 5% CO₂, 39°C e umidade saturada. Considerando o dia da fecundação como D0; a clivagem e as taxas de blastocistos foram avaliadas no dia D2 e D7, respectivamente. Setenta e um (71) blastocistos foram produzidos de um total de 326 CCO maturados. Os CCO recuperados e maturados foram analisados pelo teste GLM do SAS e as médias comparadas pelo teste de Tukey. A clivagem e taxas de blastocistos foram analisadas pelo teste do χ^2 . A média do número de CCO recuperados (6,7 a 24) e viáveis (6,0 a 23) por sessão variou ($P < 0,05$) entre doadoras. A clivagem e taxas de blastocistos também variaram ($P < 0,05$) entre doadoras, de 27 a 70% e 4 a 32%, respectivamente. A observação que o número de CCO recuperados e taxas de blastocistos variou entre doadoras, sugere a possibilidade de maior incremento na produção de embriões através da seleção de doadoras.

Apêndice II

Resumo apresentado na XIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de
Tecnologia de Embriões (SBTE), 25 a 28 de agosto de 2005,
Angra dos Reis, RJ.

CONTROLE DO OXIGÊNIO NA MIV E FIV DE OÓCITOS BOVINOS: EFEITO SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E TAXA DE PRENHEZ

(OXYGEN TENSION IN THE IVM AND IVF OF BOVINE OCYTES: EFFECT ON
THE EMBRYONIC DEVELOPMENT AND PREGNANCY RATE)

CONTROLE DO OXIGÊNIO NA MIV E FIV DE OÓCITOS BOVINOS: EFEITO SOBRE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E TAXA DE PREENHIZ

Leivas, F.G.^{1,3}; Brum, D.S.³; Saliba, W.P.³; Alvim, M.T.T.³; dos Santos, M.V.¹; Bernardi, M.L.²; Rubin, M.I.B.¹; Silva, C.A.M.¹

¹ Embryolab- Laboratório de Embriologia Animal – DCGA, HCV, CCR, Universidade Federal de Santa Maria. 97.105-900, Santa Maria-RS. ² Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS. ³ Nova Índia-Cenatte Embriões, Cx..Postal 570, 38.001-970, Uberaba-MG.

Manter a concentração de oxigênio durante a maturação (MIV) e fecundação *in vitro* (FIV) de oócitos bovinos, em níveis próximos aos encontrados no trato reprodutivo da vaca, pode ser uma alternativa para a melhoria do sistema de PIV. Com isso, seria possível minimizar o estresse oxidativo e melhorar a qualidade embrionária. Com objetivo de avaliar o efeito concentração de 5% de oxigênio na MIV e FIV, 11 sessões de OPU/PIV foram conduzidas em 48 animais com a recuperação de 1092 oócitos viáveis. Os oócitos foram distribuídos em grupos de 10 a 20, homogeneamente quanto à qualidade. A maturação foi conduzida em gotas de 100 μ L de TCM-199 acrescido de FSH, LH e 10 % de SFB, sob óleo mineral, em estufa por 24h, a 39°C, umidade saturada e atmosfera de 5% de CO₂ em ar (grupo 20% de O₂) ou 5% de CO₂, 5%O₂, 90% N₂ (grupo 5% de O₂). O sêmen de dois touros *Bos indicus* foram selecionados por gradientes de Percoll na dose de 2 x 10⁶ espermatozoides/mL. A FIV foi conduzida em gotas de 100 μ L de Fert-TALP com heparina e PHE por 18 a 24h, a 39°C, umidade saturada e atmosfera gasosa de 5% de CO₂ em ar ou 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂. O cultivo foi conduzido em gotas de 100 μ L de SOFaaci (Holm *et al.*, 1999), por 6 a 8 dias em estufa a 39°C, umidade saturada e atmosfera gasosa com 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% N₂. Os embriões obtidos de 5 rotinas foram avaliados *in vitro* até a eclosão dos blastocistos em D9 (D0=dia da fecundação). Noutras 6 rotinas, após a avaliação em D7 efetuou-se a transferência dos embriões para receptoras. Os percentuais de clivagem e de blastocistos foram submetidos à ANOVA pelo procedimento GLM (SAS, 1989). As taxas de eclosão, de blastocistos grau I e de prenhez foram comparadas por Qui-quadrado com significância de 5%. Não houve diferença na taxa de clivagem (69,6 e 70,4%), no desenvolvimento embrionário (37,3 e 38,4%) e em blastocistos grau I em D7 (78,9 e 74,7%) entre 5% de O₂ e 20% de O₂, respectivamente. A eclosão em D9 sob os oócitos MIV foi superior no grupo 5% de O₂ (21,3 vs 10,8%). No entanto, a taxa de prenhez foi similar: 25,8% (34/132) e 33,6% (49/146) entre os grupos MIV e FIV com 5% e 20% de O₂, respectivamente. Não houve comprometimento da produção de blastocistos e a sua qualidade, bem como na taxa de prenhez quando a maturação e fecundação *in vitro* foram conduzidas com 5% de oxigênio.