



CONEXÃO UNIFAMETRO 2021

XVII SEMANA ACADÊMICA

ISSN: 2357-8645

COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES MEIOS COMERCIAIS PARA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Yhála Lorena Paulino Sampaio

Discente - Centro Universitário Fametro - Unifametro
yhala.sampaio@aluno.unifametro.edu.br

Gabriel Acacio de Moura

Mestrando - Universidade Estadual do Ceará - UECE
gabrielacacio.ed@gmail.com

Maiana Silva Chaves

Docente - Universidade Estadual do Ceará - UECE
maiana.chaves@uece.br

Vicente José Figueirêdo Freitas

Docente - Universidade Estadual do Ceará - UECE
vicente.freitas@uece.br

Área Temática: Clínica e biotecnologias aplicadas em medicina veterinária
Encontro Científico: IX Encontro de Iniciação à Pesquisa

RESUMO

Introdução: A Produção *in vitro* de Embriões (PIVE) é uma biotécnica reprodutiva utilizada para acelerar o melhoramento genético dos rebanhos, além de ser uma importante ferramenta para pesquisas na área de embriologia. A PIVE é composta pela etapa de aspiração folicular, maturação (MIV) e fecundação de oócitos (FIV), além do cultivo *in vitro* de embriões (CIV). Apesar do uso crescente da PIVE, a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* ainda permanece inferior à de embriões produzidos *in vivo* e esse fato pode ser influenciado pela composição dos meios utilizados. **Objetivo:** Realizar uma análise comparativa entre dois meios de cultivo comerciais usados para PIVE bovina. **Métodos:** Foi utilizado ovários de fêmeas bovinas colhidos no matadouro. Após a aspiração dos folículos entre 2 e 8mm de diâmetro, busca e classificação dos oócitos, estes foram divididos igualmente no Grupo 1 e 2, que representam os diferentes meios comerciais utilizados. Após maturação por 24 horas e FIV por 18 horas, no D2 e D7 do cultivo foram avaliados a taxa de clivagem e de blastocistos produzidos nos dois grupos utilizando o teste qui-quadrado e considerando um nível de significância de 5%. **Resultados:** Não foi constatada diferença significativa entre o Grupo 1 e Grupo 2 nas taxas de clivagem e blastocisto. Essa similaridade entre os resultados indica meios com composições equilibradas e passíveis de serem adotadas em laboratórios. **Considerações finais:** A disponibilidade de meios comerciais para serem utilizados na PIVE favorece a aplicação da PIVE como alternativa para o melhoramento genético de rebanhos

bovinos brasileiros. **Palavras-chave:** Blastocistos; Clivagem; Oócitos; Meios.

INTRODUÇÃO

A Produção *in vitro* de Embriões (PIVE) é uma biotécnica reprodutiva que vem sendo exponencialmente utilizada ao longo dos anos, uma vez que, além de permitir acelerado melhoramento genético nos rebanhos, possibilita melhor conhecimento sobre a embriologia (CAMARGO *et al.*, 2006).

A PIVE é composta pela etapa de aspiração folicular, maturação (MIV) e fecundação de oócitos (FIV), além do cultivo *in vitro* de embriões (CIV) (GOUVEIA, 2011). Na primeira etapa, que consiste na aspiração do folículo, os complexos cumulus-oócitos podem ser adquiridos de folículos de ovários de fêmeas vivas ou oriundos de matadouros. Quando obtidos de animais vivos, a coleta ocorre por meio de laparotomia ventral média (BALDASSARRE e KARATZAS, 2004), por laparoscopia (COL), (BALDASSARRE e KARATZAS, 2004) e pela aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia – Ovum pick up, a mais comumente utilizada em bovinos (ALVES *et al.*, 2001). Esta técnica permite recuperar oócitos de fêmeas vivas de forma prática, com maior frequência e com menores efeitos colaterais a saúde de fêmeas pré-púberes, adultas, senis ou com problemas de infertilidades adquiridos (GOODHAND *et al.*, 1999; TANEJA *et al.*, 2000).

Após a obtenção dos oócitos, estes são classificados quanto às características e quantidade de camadas de células do cumulus que o envolve, bem como do aspecto do seu citoplasma. Assim, segundo Gonçalves *et al.* (2007) e Avelar *et al.*, (2018), os complexos cumulus-oócitos podem ser classificados em Grau I (cumulus compacto com multicamadas e citoplasma levemente granuloso), Grau II (uma a três camadas de células do cumulus e citoplasma finamente granuloso), Grau III (incompleto ou nenhum investimento celular ou citoplasma heterogêneo) e Grau IV (oócito com forma anormal e citoplasma heterogêneo ou oócito apoptótico). Nessa etapa o oócito irá completar sua maturação para que posteriormente torna-se apto para a fertilização e desenvolvimento embrionário (MALEKI *et al.*, 2016).

A FIV ocorre 24 horas depois da MIV, momento este em que os oócitos maduros são fecundados pelo espermatozoide, gerando o zigoto (MELO *et al.*, 2016). É nesta etapa que ocorre a seleção espermática, através de métodos, como o gradiente de densidade de Percoll, e sua capacitação, com utilização de substâncias a exemplo da heparina (FONSECA, 2010;

WRENZYCKI, 2016). Segundo Gonçalves et al., (2007), a FIV deve passar pelo mesmo processo de incubação que a MIV, em atmosfera de 5% de CO₂, a 38,5°C em umidade saturada, por 18 horas.

A CIV tem como objetivo proporcionar condições favoráveis para que o embrião se desenvolva até a fase de blastocisto (FONSECA et al., 2010). Entretanto, para a aquisição de boas taxas de produção e de qualidade dos embriões, avaliadas no sétimo dia de cultivo, todo o processo *in vitro* deve ser aproximado do *in vivo*, o que inclui pH, oxigênio, hormônios e nutrientes em condições e concentrações próximas às do ambiente uterino (FIGUEIREDO, 2010; WRENZYCKI, 2016).

Mesmo com o uso crescente da PIVE (IETS, 2021), a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* ainda permanece inferior à de embriões produzidos *in vivo* e esse fato pode ser influenciado pela composição dos meios utilizados (WOOLDRIDGE, NARDI, EALY, 2019). Portanto, diante da variedade de meios comerciais disponíveis, o trabalho tem como objetivo comparar meios comerciais utilizados na PIVE bovina.

METODOLOGIA

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (n° 09115656/2020), da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

Os ovários de fêmeas bovinas foram coletados em abatedouros locais e transportados ao laboratório dentro de 2 - 4 horas em solução de transporte composta por solução salina com 0.9% de NaCl e 0.1% de penicilina-estreptomicina a 37°C. No laboratório, os ovários eram colocados em becker contendo a mesma solução de transporte previamente aquecida e mantida em banho maria a 38,5°C. Os folículos entre 2 e 8mm de diâmetro foram puncionados com auxílio de seringa de 10mL e agulha de calibre 1,2x40mm, e o fluido folicular transferido para tubos falcon de 50mL mantidos, também, no banho maria.

Após a punção, o fluido permanecia no tubo por 10 minutos para a decantação das estruturas. Em seguida, o pellet era colocado em placas de petri e com auxílio de estereomicroscópio ocorria o rastreamento das estruturas e posterior classificação dos os CCOs em Grau I, II, III e IV (Avelar et al., 2012). Oócitos considerados como Grau I, II e III foram distribuídos equitativamente e aleatoriamente no Grupo 1 (empresa A) e Grupo 2

(empresa B), colocados em meio de maturação do respectivo grupo e submetidos a maturação por 24 horas, em incubadora com 5% de CO₂ a 38,5 °C.

Decorrido o período da MIV, os oócitos foram incubados com espermatozoides selecionados por Percoll, e seguiu por 18 horas nas mesmas condições que ocorreu a maturação. Posteriormente, os presumíveis zigotos foram lavados no meio de cultivo e transferidos para microgotas, recoberto por óleo mineral e levados para a incubadora de três gases (5% CO₂, 5% O₂ e 90 N₂) a 38,5°C por 7 dias. No segundo dia após a fertilização (D2) foi avaliado a taxa de clivagem e no D7 foi avaliado a taxa dos blastocistos.

Para comparar a taxa de clivagem e quantidade de blastocistos produzidos nos dois grupos foi utilizado o teste do qui-quadrado, considerando um nível de significância de 5%, pelo software R Studio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada diferença ($P>0,05$) na taxa de clivagem do Grupo 1 (54,54%) em relação ao Grupo 2 (52,28%). Da mesma forma, não foi constatada diferença ($P>0,05$) na taxa de blastocisto produzida no Grupo 1 (27,27%) e no Grupo 2 (20,51%).

Ao que descreve alguns autores (GUTIÉRREZ-ADÁN et al., 2001; FIGUEIRÓ et al., 2002; MOZZAQUATRO et al., 2004), a utilização de determinados componentes nos meios comerciais favorece uma boa maturação com posterior fecundação e desenvolvimento do blastocisto. Os meios normalmente utilizados na PIVE são constituídos de substâncias que além de disponibilizar nutrientes para a formação de blastocistos, atuam indiretamente evitando estresses intrínsecos a técnica e que podem comprometer o resultado (SIGNORELLI et al., 2005). Taxas similares obtidas nos dois grupos indicam meios com composições equilibradas e passíveis de serem adotados em laboratórios, possibilitando de forma prática a multiplicação de animais superiores a partir da utilização da PIVE

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos, constatou-se que a eficiência dos meios comerciais disponíveis para serem utilizados na PIVE favorece a aplicação da PIVE nos rebanhos bovinos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, J. D. R.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; CALDAS, J. G. L.; FILHO, A. S. S.; BARRETO, M. B. P. Altas concentrações de FSH-p na maturação in vitro de oócitos Bos indicus. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 645-649, 2001.
- ANTONIOLLI, C. B. Produção In Vitro de Embriões Bovinos Utilizando Diferentes Condições de Maturação. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) / Faculdade de Veterinária, Porto Alegre-RS, Agosto, 2005, 32p.
- ANTONIOLLI, C. B.. Produção in vitro de embriões bovinos utilizando diferentes condições na maturação oocitária. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2005.
- AVELAR, S.; MOURA, R.; SOUSA, F.; PEREIRA, A.; ALMEIDA, K.; MELO, C.; TELES-FILHO, A.; BARIL, G.; MELO, L.; TEIXEIRA, D.; FREITAS, V. Oocyte production and in vitro maturation in Canindé goats following hormonal ovarian stimulation. *Animal Reproduction (AR)*. 9, 27-32, (2018).
- BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C.N.. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci*, v. 82-83, p.255-266, 2004.
- BECHER, B. G.. FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES (PIVE) EM BOVINOS. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.15 n.28; p. 2018.
- CAMARGO L; VIANA J; SÁ W; FERREIRA A; RAMOS A; FILHO V. Factors influencing in vitro embryo production. *Animal reproduction*. v. 3, p. 19-28, 2018.
- da SILVA, J.S.. Aspectos comerciais da transferência de embriões e fertilização in vitro em bovinos - revisão. *Revista Eletrônica Nutritime*, Vol. 12, Nº 05, set/out de 2015.
- de SOUZA, N. S.. PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS: ETAPAS DE PRODUÇÃO E HISTÓRICO NO BRASIL. *Ciência Veterinária UniFil*, v. 1, n. 3, jul./set. 2018.
- DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C.; BUENO, V. G.; ALVES, G. O. Efeito do Tamanho do Folículo na Maturação Nuclear e Citoplasmática de Ovócitos de Fêmeas Zebuínas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, nº 1, Jan., 2000, p. 207-214.
- dos SANTOS, C. A.. Avanços da produção in vitro de embriões bovinos. Monografia (graduação) - Universidade Federal do Maranhão, Centro de ciências agrárias e ambientais - Chapadinha, MA, 2017.
- FONSECA, J. F.; SOUZA, J. M. G.; CAMARGO, L. S. A.. Produção de oócitos e embriões de pequenos ruminantes: passado, presente e futuro. *Anais*. 24, 2010,. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologias de Embriões, p.85-96, 2010.
- FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos taurus indicus*) cattle. *Theriogenology*, [s.l.], v.47, p.1489- 1505, 2010.
- FREITAS V; SOUZA-FABJAN J; MERMILLOD P; MELLO L; TEIXEIRA D. Estado da arte e perspectivas da produção in vitro de embriões em caprinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.41, p.201-207, 2017.
- FIGUEIRÓ, G. M.; FIALHO, S. S.; BRUM, D. S.; PASIN, M.; RAUBER, L. P.; BERNARDI, M. L.; MEZZALIRA, A.; RUBIN, M. I. B.; SILVA, C. A. M.. Produção in vitro de embriões bovinos com soro de égua em diferentes fases do estro. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.30, p.1, p.1-8, 2002.



GILIARDI S; SALL W; CAMARGO L; FERREIRA A; MACHADO M; SERAPIÃO R; SOARES A; PINHO T; VIANA J. Efeito de diferentes meios de cultivo no desenvolvimento e proporção do sexo de embriões bovinos produzidos in vitro. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v. 56, p. 623-627, 2004.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q.. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.31, p.212-217, 2007.

GOODHAND, K.L.; WATT, R.G.; STAINES, M.E. et al. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. Theriogenology, v.51, p.951-961, (1999).

GOUVEIA, F. F.. A produção in vitro de embriões bovinos. Monografia (graduação) - Universidade de Brasília, Faculdade de agronomia e Medicina veterinária - Brasília, DF, 2011.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D. et al. Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. Theriogenology, v.55, p.1117-1126, 2001.

International Embryo Technology Society. Disponível em: <<https://www.iets.org/>> Acessado em: 05.10.21.

KLÜPPEL, L. M.. UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SORO FETAL BOVINO (SFB) NOS MEIOS DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E DIMINUIÇÃO DE CUSTOS OPERACIONAIS. Trabalho de conclusão do curso (graduação) - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - Brasília, DF, 2012.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M. P. Factors Influencing Oocyte and Embryo Quality in Cattle. Reproduction Nutrition Development, v. 41, 2001, p. 427-437.

LUSTOSA, A. A.. Aspectos relevantes na produção comercial de embriões bovinos por meio da técnica biotecnológica de fertilização in vitro: Revisão. PUBVET v.12, n.3, a51, p.1-6, Mar., 2018.

MALEKI, E. M.; EIMANI, H.; BIGDELI, M. R.; NARENJI, A. G.; MSC ABEDI, R.. Effects of Crocin Supplementation during in vitro Maturation of Mouse Oocytes on Glutathione Synthesis and Cytoplasmic Maturation. Int J Fertil Steril. v.10, p.53-61, 2016.

MELLO R; FERREIRA J; DE SOUSA S; MELLO M; PALHANO H. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. Animal reproduction. v.40, n.2, p.58-64, 2016.

OPIELA J; BULBUL B; ROMANEK J. Varied Approach of Using MSCs for Bovine Embryo In Vitro Culture. Animal Biotechnology. v. 31, p. 1-8, 2020.

MOZZAQUATRO, F. D.. PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS EM MEIO SUPLEMENTADO COM FONTES PROTÉICAS DEFINIDAS E INDEFINIDAS. Archives of Veterinary Science v. 9, n. 1, p. 101-106, 2004.

SIGNORELLI, P.; GHIDONI, R.. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. J Nutr Biochem 2005;16: 449-66.

SILVA, L. G. R.. Análise crítica do método de produção "in vitro" e transferência de embriões bovinos a partir de oócitos captados "in vivo" e maturados em meio comercial e meios patenteados. Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Brasília, DF, 2013.

TANEJA, M.; BOLLS, P.E.J.; VELDE, V. Development competence of juvenile calf oocytes in



CONEXÃO UNIFAMETRO 2021

XVII SEMANA ACADÊMICA

ISSN: 2357-8645

vitro and in vivo: influence of donor animal, variation and repeated gonadotrooin stimulation. *Bio. Reprod.*, Champaign, v. 62, p. 206-213, (2000).

WELLS, D. N.. Transferência nuclear: a importância das células doadoras e receptoras para reprogramação nuclear e capacidade de clonagem em mamíferos. *Anais. 24*, 2010,. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologias de Embriões, p.189-206, 2010.

WOOLDRIDGE L; NARDI M; EALY A. Zinc supplementation during in vitro embryo culture increases inner cell mass and total cell numbers in bovine blastocysts. *Journal of Animal Science*. v. 12, p. 4946–4950, 2019.

WRENZYCKI, C.. Sistemas de cultivo in vitro: quão longe estamos das condições ideais?. *Anais. 30*, 2016,. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologias de Embriões, Foz do Iguaçu, p.155-159, 2016.