

MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS UTILIZANDO MEIO CONTENDO FATORES LIBERADOS EM PRÉVIA MATURAÇÃO DE OÓCITOS

In vitro Maturation of Bovine Oocytes Using Medium Contents Factors Released Prior To Oocytes Maturation

Vinicius Antônio Chiot¹; Alessandra Lazarin²; Andreza de Fátima Cordeiro³; Maria Theresa Scheffer Pereira da Silva⁴; João Filipi Scheffer Pereira⁵

Palavras-chave: Embriões. Produção *in vitro*. TCM 199.

Introdução

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos é uma importante biotecnologia utilizada para a aceleração do melhoramento genético. Consiste de três etapas laboratoriais, sendo a maturação *in vitro* de oócitos (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) (Thompson, 2000). A maturação *in vitro* envolve dois processos, a maturação nuclear e a citoplasmática. A maturação nuclear consiste na retomada e progressão da meiose até o estágio de metáfase II da meiose II e a extrusão do primeiro corpúsculo polar (Varago et al., 2008). Uma vez retirado do fluido folicular, que contém inibidores da maturação, a retomada e progressão da meiose ocorre independente das condições ofertadas no meio de cultivo (Gonçalves et al., 2007). A maturação citoplasmática é um processo de difícil avaliação e consiste basicamente na reorganização das organelas citoplasmáticas e na síntese de mRNA (Gonçalves et al., 2007). A ocorrência dos dois processos de maturação, nuclear e citoplasmático, permite ao oócito que, quando fecundado, tenha potencial para o desenvolvimento embrionário (Gonçalves et al., 2007; Varago et al., 2008) sendo a produção de blastocistos um fator fidedigno de avaliação indireta da maturação oocitária. Os meios de MIV mimetizam as condições encontradas durante o processo de maturação *in vivo* (Sangild, 2000). Esses eventos são desencadeados por uma cascata de fosforilação e desfosforilação das enzimas quinases e fosfoquinases que atuam no fator promotor de maturação (MPF), responsável pela retomada e término da maturação dos oócitos em mamíferos (Gonçalves et al., 2007). O aumento gradativo destes fatores é observado durante o processo de maturação oocitária (Gonçalves et al., 2007). A hipótese deste estudo é que a maturação de oócitos bovinos em meio MIV onde foi maturado previamente outro grupo de oócitos aumenta as taxas de produção embrionária *in vitro*.

Material e métodos

Oócitos grau 1 e 2 (n = 340) obtidos de ovários de abatedouro foram encaminhados para o Laboratório de Cultivo Celular da Universidade Tuiuti do Paraná. Divididos em dois grupos (controle

1 Curso de Medicina Veterinária, UTP

2 Curso de Medicina Veterinária, UTP

3 Curso de Medicina Veterinária, UTP

4 Curso de Biomedicina – UNICNEC

5 Professor Orientador – UTP

e tratado). Os oócitos do grupo controle foram maturados por 24 h, em meio MIV padrão com base TCM 199, acrescido de 10% SFB e gonadotrofinas (FSH e LH). No grupo tratado o meio foi composto por 50% de meio MIV onde oócitos foram maturados no dia anterior ao experimento e 50% de meio MIV padrão. A FIV ocorreu por um período de 22 h, em meio Fert-TALP, contendo BSA, utilizando um único reprodutor de mesma partida e lote para a fertilização dos grupos controle e tratado. Os zigotos foram cultivados em meio CR2 contendo BSA e 5% SFB por sete dias. A avaliação foi realizada pela taxa de clivagem (clivados/oócitos), cinética de desenvolvimento embrionário em D7 (taxa de embriões/oócitos) total e nos diferentes estágios embrionários e embriões eclodidos em D9 (eclodidos/embriões em D7). A análise estatística utilizada foi ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5%.

Resultados e discussão

Na Tabela 1 estão apresentadas as médias do grupo tratado e controle para taxa de clivagem, cinética de desenvolvimento embrionário nos estágios de blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido no dia 7 (D7) de CIV, taxa total de embriões produzidos em D7 e taxa de eclosão embrionária em D9. Não foram encontradas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os parâmetros avaliados entre grupo tratado e controle. Os valores de taxas de clivagens, total de embriões em D7 e eclosão embrionária em D9, são semelhantes às encontradas por outros autores para taxa de clivagem, embriões bovinos em D7 e eclosão embrionária (Li et al., 2006; Gonçalves et al., 2007; Varago et al., 2008).

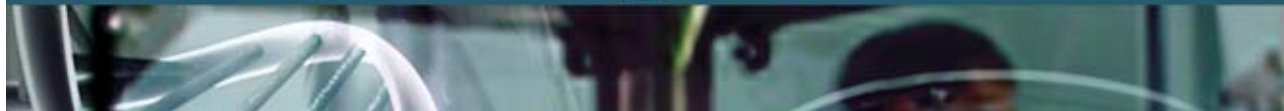
Tabela 1: Número (n) de oócitos e porcentagem média observada na taxa de clivagem, cinética de produção embrionária no dia 7 (d7) de cultivo *in vitro*, nos estágios de blastocisto (Bl), blastocisto expandido (Bx), blastocisto eclodido (Be) e total de embriões e taxa de eclosão embrionária no dia 9 (D9) para os grupos tratado e controle.

Grupo	Oócitos (n)	Clivagem (%)	Tx. Bl %	Tx. Bx %	Tx. Be %	Tx. EmbriõesD7 (%)	Tx. Eclosão D9
Tratado	168	75.6 ^a	40.7 ^a	35.5 ^a	23.6 ^a	30.3 ^a	75.3 ^a
Controle	145	72.3 ^a	55.3 ^a	31.2 ^a	13.4 ^a	36.8 ^a	84.4 ^a

Letras diferentes na coluna entre os tratamentos de cada experimento indicam diferença estatística ($p < 0,05$).
Taxa de clivagem (%) de zigotos com ≥ 2 células, calculada em relação ao número de zigotos (n).

Conclusão

A maturação utilizando meio de maturação *in vitro* com prévia maturação de oócitos não contribuiu para o aumento da taxa de embriões produzidos *in vitro*.



Referências

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

LI, R.; WEN, L.; WANG, S.; BOU, S. Development, freezability and amino acid consumption of bovine embryos cultured in synthetic oviductal fluid (SOF) medium containing amino acids at oviductal or uterine-fluid concentrations. *Theriogenology*, v.66, p.404-414, 2006.

SANGILD, P.T.; SCHMIDT, M.; JACOBSEN, H. et al. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from *in vitro* produced bovine embryos. *Biology of Reproduction*, v.62, p.1495-1504, 2000.

THOMPSON, J.G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.263-275, 2000.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.32, p.100-109, 2008.