

ESTUDO SOBRE O CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS DURANTE O TRANSPORTE

STUDIES ON IN VITRO BOVINE EMBRYOS DURING THEIR TRANSPORT

F. L. B. CAVALIERI¹, M. A. ANDREAZZI², A. H. B. COLOMBO³, I. P. EMANUELLI⁴,
D. A. B. MORESKI⁵, W. M. SILVA⁶

RESUMO

A pecuária brasileira é, em parte, sustentada pela utilização e aperfeiçoamento de biotecnologias da reprodução. Pesquisas que buscam solucionar problemas como a distância existente entre os laboratórios e as grandes fazendas produtoras de gado são necessárias. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de um sistema de cultivo durante períodos longos de transporte de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Os oócitos, obtidos de ovários de vacas de abatedouro, passaram pelos procedimentos de produção de embriões *in vitro*, e no quinto dia do cultivo, foram alocados no sistema de transporte para compor os tratamentos: Tcontrole – embriões controle mantidos na incubadora; T48 - embriões retirados do meio de cultivo no 5º dia e simulado o transporte por 48 horas; T24 - embriões retirados do meio de cultivo no 6º dia e simulado o transporte por 24 horas. Após os tratamentos, os embriões foram avaliados quanto à taxa de blastocistos no 7º dia e a taxa eclosão no 9º dia. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos e cinco repetições cada. Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) na taxa de blastocisto (31, 33 e 35%) e na taxa de eclosão (74, 78 e 80%), respectivamente para os tratamentos Tcontrole, T48 e T24. Concluiu-se que o sistema de cultivo durante o transporte, por até 48 horas, foi eficiente quanto à viabilidade embrionária inferindo que o ambiente de transporte simulou as condições de atmosfera e de temperatura do laboratório de forma satisfatória.

PALAVRAS-CHAVE: Biotecnologia da reprodução. Blastocistos. Produção *in vitro* de embriões.

SUMMARY

The Brazilian livestock is based on the use and in the improvement of reproductive biotechnologies. Researches that aims to solve problems such as the distance between laboratories and the large cattle producing farms are necessary. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of a culture system during long periods of transportation on bovine embryos produced *in vitro*. The oocytes obtained from slaughterhouse cows ovaries, passed through *in vitro* production of embryos procedures such as: maturation, fertilization and embryo culture and subsequently were allocated into the transportation system to compose the treatments: Tcontrol - control embryos kept in the incubator; T48 - embryos removed from the culture medium on the 5th day and transportation simulated for 48 hours; T24 - embryos removed from the culture medium on the 6th day and transportation simulated for 24 hours. After the treatments, the embryos were evaluated for blastocyst on the 7th day and hatching rate on the 9th day. The experimental design was completely randomized. No differences were found ($P > 0.05$) for blastocyst rate (31, 33 and 35%) and hatching rate (74, 78 and 80%), respectively, for Tcontrol, T48 and T24 treatments. It was concluded that the culture system during transport, up to 48 hours, was efficient when considering the embryonic viability, inferring that the transportation environment simulated atmosphere and temperature conditions of the laboratory in a satisfactory manner.

KEY-WORDS: Biotechnology reproduction. Blastocysts. *In vitro* production embryos.

¹ Prof. Dr. do Curso de Medicina Veterinária e do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas do Centro Universitário de Maringá/ Unicesumar. E-mail: fabio.cavaliere@unicesumar.edu.br / fbim52@hotmail.com

² Prof^a. Dr^a. do Curso de Medicina Veterinária e do Mestrado em Tecnologias Limpas/ Unicesumar.

³ Prof. do Curso de Medicina Veterinária e aluno do Mestrado em Tecnologias Limpas/ Unicesumar.

⁴ Prof^a. Dr^a. do Curso de Medicina Veterinária e do Mestrado em Tecnologias Limpas/ Unicesumar.

⁵ Bióloga, funcionária do Laboratório de Biotecnologia/ BIOTEC / Unicesumar.

⁶ Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária/ Unicesumar

INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira é de importância fundamental para o desenvolvimento da economia do país, pois fornece alimento para a população e gera emprego e renda (BRASIL, 2013). O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo e coloca-se como segundo maior produtor e o primeiro exportador mundial de carne bovina (CONAB, 2015).

A posição de destaque alcançada na bovinocultura é auxiliada por pesquisas que contemplam o aperfeiçoamento das biotecnologias da reprodução, como a inseminação artificial, transferência de embriões e produção *in vitro* de embriões, sendo que, esta última, se caracteriza, por aumentar expressivamente, o número de descendentes de um animal de mérito genético superior. Grande parte dessas pesquisas envolvem métodos que buscam melhorar todas as etapas dos programas de produção *in vitro* de embriões (PIVE) (GONÇALVES *et al.*, 2008). Como resultado, a PIVE vem obtendo avanços consideráveis nos últimos anos e está sendo amplamente incorporada aos sistemas de produção e reprodução em bovinos (PONTES *et al.*, 2011).

Para se realizar a PIVE com sucesso, é necessário um alto investimento em estrutura física e equipamentos, quando comparada à transferência de embriões convencional, por isso, a viabilidade econômica desta técnica é influenciada pela escala de uso e pela demanda por animais geneticamente superiores (SIQUEIRA *et al.*, 2012).

Dentre as pesquisas que visam os melhores resultados com o emprego da PIVE, destacam-se o estudo da função, desenvolvimento e metabolismo de gametas e embriões, utilização da ultrassonografia, desenvolvimento de fármacos seguros e efetivos, desenvolvimento de meios de cultivo (VARAGO *et al.*, 2008) e, atualmente, é reconhecido também como fator limitante para o sucesso desta técnica, a distância e o tempo decorrido no transporte dos embriões (LOIOLA *et al.*, 2014).

Considerando que os principais laboratórios de produção *in vitro* estão localizados nas regiões sul e sudeste do Brasil e que, as grandes fazendas produtoras de bovinos, localizam-se em novas áreas de produção, ao norte do Brasil, o tempo gasto no transporte, pode interferir diretamente na viabilidade dos embriões e nas taxas de prenhez (MARINHO *et al.*, 2012).

Uma opção para o transporte dos embriões, em longas distâncias, é o transporte no próprio meio de cultivo, com controle da atmosfera gasosa, em incubadora portátil. Neste caso, os embriões são transportados em diferentes estádios de desenvolvimento, de maneira que, o fim do transporte coincida com o fim do cultivo (PONTES *et al.*, 2011). Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de um sistema de cultivo durante períodos longos de transporte de embriões bovinos produzidos *in vitro*, mediante simulação de transporte embrionário por 24 e 48 horas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ovários, obtidos de vacas mestiças, abatidas em um frigorífico na região noroeste do Paraná, no período de Maio a Julho de 2014. Os ovários foram transportados para o laboratório do Centro de Biotecnologia da Reprodução localizado na Fazenda Experimental do Centro Universitário de Maringá - Unicesumar, Maringá/PR, em garrafas térmicas, contendo solução fisiológica (0,9% NaCl), em temperatura entre 35 a 37°C.

No laboratório, os ovários foram lavados em álcool 70%, solução salina e mantidos em banho-maria a 37°C, sendo realizada aspiração folicular imediatamente. Os folículos com diâmetro entre 2 a 8 mm foram aspirados com o auxílio de uma agulha calibre 18 Gauge, acoplada a uma seringa de 10 mL. O período entre o abate e o início da aspiração não foi superior a 2 horas. Todo o material aspirado foi transferido para tubos Falcon de 50 mL. O sedimento foi transferido para placas de Petri, de poliestireno, de 60 mm de diâmetro e avaliado sob estereomicroscópio com aumento de 50x, para seleção e classificação dos oócitos.

Como critério de avaliação, os oócitos foram classificados de acordo com a sua morfologia (número de camadas e o grau de expansão das células do *cumulus* e o aspecto do citoplasma quanto à cor, homogeneidade e integridade) em grau I, II, III e IV, segundo Seneda *et al.* (2002). Foram selecionados somente os complexos *cumulus* oócitos viáveis, ou seja, aqueles que apresentaram grau I e II.

Após a seleção, os complexos *cumulus* oócitos foram maturados *in vitro* em placas contendo meio TCM199 com sais de Earles (Gibco®), glutamina (Sigma® cod:G8540) e NaHCO₃ (Mallinckrodt®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®), 22 µg/mL piruvato (Biochemical® cod:44094), 50 µg/mL de gentamicina (Sigma® cod:G1272), 0,5 µg de FSH/mL (Folltropin – Bioniche®), 50 µg de LH/mL (Lutropin – Bioniche®) e 1 µg de estradiol/mL (Sigma® cod:E2758), mantidos em estufa a 38,5°C, em atmosfera com 5% de CO₂ em ar, com umidade máxima, durante 22 a 24 horas.

Na sequência, os oócitos foram colocados em uma placa contendo 35 gotas de 75 µL de meio de maturação, com 10 oócitos por gota, cobertas por óleo mineral. A fecundação foi realizada em gotas de 75 µL de meio TALP suplementado com 10 µg/mL de heparina (Sigma® cod:H3149), 22 µL/mL de piruvato (Biochemical® cod:44094), 50 µg/mL de gentamicina (Sigma® cod:G1272), albumina sérica bovina-BSA (Sigma® cod: A3311) (sem ácidos graxos) e solução de PHE (2 µM de penicilina (Sigma® cod: P4875), 1 µM de hipotaurina (Sigma® cod: H1384) e 0,25 µM de epinefrina (Sigma® cod: E4250). Foi utilizado sêmen de um touro da raça Nelore e o mesmo foi descongelado, em banho-maria a 35°C, por 30 segundos. Para seleção dos espermatozoides móveis e remoção de diluidores e do plasma seminal, foi realizada apenas uma centrifugação em gradiente de Percoll (90 e 45%), durante 9 min. A concentração

espermática empregada foi de 1×10^6 espermatozoides/mL.

Após 24 horas de fertilização, os possíveis zigotos foram cultivados *in vitro*, no meio SOF (*Synthetic Oviduct Fluid*), suplementado com 5% SFB e 0,5% de BSA. O cultivo foi realizado por 24 horas após a inseminação, em incubadora, com atmosfera gasosa controlada contendo 5% CO₂, 5% de O₂ balanceado com 90% de N₂. No dia 4 (D0: FIV) realizou-se a renovação do meio de cultivo.

O total de estruturas obtidas foi dividido aleatoriamente em três tratamentos: Tcontrole (n:110), estruturas permaneceram em cultivo por nove dias, T48 (n:118) simulação de tempo de transporte por 48 horas e T24 (n:110), simulação de tempo de transporte por 24 horas.

Os tratamentos T48 e T24 consistiram em transferir os embriões, no 5º e 6º dia de cultivo, respectivamente, da incubadora para tubos de acrílico com meio CIV, sob óleo mineral, gaseificado por 30 segundos, com mistura gasosa contendo 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂. Os tubos eram tampados com rolha de silicone e vedados com *Parafilm*[®], simulando o transporte, por 48 e 24 horas, respectivamente, no

transportador WTA[®] (Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda, Cravinhos, SP, Brasil), a 38,4 °C. Ao término deste período, as estruturas retornaram para a mesma placa de CIV, onde estavam sendo cultivadas na incubadora anteriormente.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e cinco repetições cada. As variáveis estudadas foram: taxa de blastocisto no dia 7 (D7) e taxa de blastocistos eclodidos no dia 9 (D9). O programa estatístico utilizado para a realização das análises foi o SAS (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2000), utilizando-se o procedimento "*Proc Genmod*" e distribuição binomial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos sobre o número de embriões produzidos, taxa de blastocisto no D7 e taxa de blastocistos eclodidos no D9, de embriões bovinos produzidos *in vitro* e submetidos à simulação de transporte, por 24 e 48 horas, em atmosfera gasosa controlada estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1- Produção de blastocistos bovinos, produzidos *in vitro*, após a simulação de transporte durante o cultivo embrionário por 24 ou 48 horas ou mantidos em incubadora constantemente (controle).

Variáveis	Controle	24 horas	48 horas
Número de estruturas (n)	110	118	110
Taxa de blastocisto ¹ % (n) no D7	31a (34/110)	35a (41/118)	33a (36/110)
Taxa de eclosão ² % (n) no D9	74a (25/34)	80a (33/41)	78a (28/36)

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P<0,05)

¹Taxa de blastocisto= número de blastocistos totais/número de oócitos x 100;

²Taxa de eclosão= números de blastocistos eclodidos /números de blastocistos totais x 100.

Com os dados obtidos, verificou-se que não houve diferenças (p>0,05) entre as taxas de blastocistos nos tempos avaliados, evidenciando que, mesmo quando o transporte foi prolongado, a produção de embriões foi satisfatória (33%). De fato, Brum *et al.* (2002) descreveram que a média nacional da taxa de embriões produzidos é em torno de 35% de blastocistos no 7º dia de cultivo.

Loiola *et al.* (2014) avaliaram um programa de produção *in vitro* de embriões bovinos cuja maturação oocitária e cultivo embrionário ocorreram parcialmente durante o transporte. No 6º dia de cultivo, os embriões foram transportados, em incubadora portátil, em meio de cultivo embrionário, de São Paulo para a Bahia, um tempo médio de 18 a 24 horas. Ao fim do transporte, foram avaliadas as taxas de blastocistos e blastocistos expandidos e, na sequência, foram envasados e transferidos para as receptoras. Os autores relataram que a taxa de embriões produzidos foi de 32,85%, valores semelhantes aos encontrados neste trabalho.

Alves *et al.* (2003) avaliaram a influência do transporte de oócitos, porém com uma duração menor, 6 horas, na produção *in vitro* de embriões bovinos e reportaram uma taxa de embriões produzidos de 33,6%.

Contudo, Leivas *et al.* (2004), ao trabalharem com transporte de oócitos bovinos em meio de maturação associado a um tampão orgânico Hepes, sem controle de atmosfera gasosa e com temperatura de 39°C, verificaram uma redução significativa no desenvolvimento de embriões submetidos ao transporte por até 18 horas. Os autores relataram que os resultados negativos foram em função da incapacidade do tampão em manter o pH estável por até 18 horas, fato que prejudicou o desenvolvimento dos embriões.

Semelhante à Loiola *et al.* (2014), acredita-se que os resultados positivos obtidos neste trabalho, sejam em função da menor variação do pH do meio, obtida com o controle da atmosfera gasosa, mantida com 5% de CO₂ em ar e ao controle eficiente da temperatura na incubadora portátil. Estas condições se assemelharam àquelas encontradas no laboratório durante a maturação *in vitro*. Pontes (2009) afirmou que a interação entre meio de cultivo e atmosfera gasosa é um item altamente estratégico para a PIVE, principalmente no que tange às condições de longos períodos de transporte.

Pontes (2009) avaliou um programa, em larga escala, de produção *in vitro* de embriões a partir de

fêmeas leiteiras. No trabalho, os oócitos viáveis foram maturados *in vitro* por 24 horas a 38,8°C e 5% CO₂ em ar e foi utilizado sêmen congelado sexado. Os embriões resultantes foram cultivados em condições semelhantes de temperatura e atmosfera da maturação, e tiveram seu estágio final de desenvolvimento realizado em uma estufa portátil, durante o transporte, que variou de 24 a 72 horas, para cobrir distâncias acima de 2.000 Km. O autor relatou que o esquema para o cultivo de embrião durante o transporte por longas distâncias apresentou resultados interessantes.

Max (2011) submeteu ovelhas pluríparas da raça Santa Inês à aspiração folicular e os oócitos selecionados foram envasados em TCM 199, gaseificados com CO₂ e armazenados em incubadora de transporte com ambiente controlado em 38,5°C e 5% de CO₂. O transporte rodoviário dos oócitos foi realizado durante 14 horas até o laboratório de PIVE, onde os oócitos completaram o período de maturação, foram fecundados, e tiveram o cultivo iniciado em meio de cultivo SOF. Após quatro dias, os embriões foram submetidos ao trajeto de retorno, enviados nas mesmas condições de transporte. A autora concluiu que foi possível obter prenhez a partir da PIVE, com transportes de oócitos e embriões por até 14 horas.

Miranda *et al.* (2007) relataram que ainda são necessários estudos mais abrangentes visando o aperfeiçoamento do sistema de produção de embriões *in vitro*, com relação ao cultivo, transporte e manutenção, apesar de que, atualmente, existam vários modelos de incubadoras portáteis e de fácil transporte, desenvolvidas especificamente para cultivo de oócito/embrião. De fato, o incremento de pesquisas em diferentes áreas da biotecnologia e da fisiologia promove o aumento nos índices de produção embrionária *in vitro* (SENEDA *et al.* 2002, VARAGO *et al.* 2008).

Fert Vitro (2015) publicou que o transporte de embriões em estufa portátil, mantendo as mesmas condições oferecidas aos embriões dentro do laboratório, retirados da incubadora no quinto ou sexto dia após a fecundação e transportados até o local onde se encontram as receptoras traz como vantagem, o fato do criador manter suas doadoras em uma área menor, próximo ao laboratório e enviar seus embriões para outras regiões maiores e mais distantes, resultando na melhora genética de seu rebanho de forma rápida e consistente.

CONCLUSÃO

O sistema de cultivo embrionário durante o transporte por até 48 horas é viável quantitativamente, podendo afirmar, que a maneira pela qual, os embriões foram transportados, simulou as condições de atmosfera e de temperatura do laboratório, de forma satisfatória. Desta forma, acredita-se que o emprego desta biotecnologia, de forma comercial e em larga escala, viabiliza o envio de embriões para propriedades distantes dos laboratórios de produção de embriões.

AGRADECIMENTOS

À Milena Brandão Seko, bióloga, funcionária do BIOTEC/ Unicesumar, pelo apoio laboratorial, e à Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Ribeiro, pelo auxílio na redação do abstract.

REFERÊNCIAS

ALVES, D.F.; RAUBER, L.P.; RUBIN, F.B.; BERNARDI, M.L.; DEZEN, D.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B. Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. São Paulo. v.40, p. 279-286, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil. Assessoria de Gestão Estratégica (Org.). Projeções do Agronegócio, Brasil 2012/13 a 2022/23. Brasília, 2013. Disponível em <[http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%20Agronegocio%20Brasil%202011-20012%20a%202021-2022%20\(2\)\(1\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%20Agronegocio%20Brasil%202011-20012%20a%202021-2022%20(2)(1).pdf)>. Acessado em 26/03/2015.

BRUM, D.S.; LEIVAS, F.G.; BERNARDI, M.L.; RAUBER, L. P.; MEZZALIRA, A. B.; SILVA, K.E.; MONDINI, C. A.; RUBIN, M. I.B.. Cultivo individual de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. São Paulo, v.39, n.2, p. 87-92, 2002.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Indicadores da Agropecuária: Quadro de Suprimentos. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1538&t=2>>. Acessado em 14/03/2015.

FERT VITRO –Laboratório de Fertilização *in vitro*. FertVitro realiza transporte de embriões em longas distâncias com bons resultados. Disponível em: <http://www.fertvitro.com.br/index.php?option=com_content&view=article&id=84:fertvitro-realiza-transporte-de-embrioes-em-longas-distancias-com-bons-resultados&catid=34:noticias&Itemid=75>, acessado em 19/03/2015.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2^a. ed, São Paulo, SP: Roca, 2008. 395p.

LEIVAS, F.G.; BRUN, D.S.; MEZZALIRA, A.; PILLA, L. F.C.; BERNARDI, M. L.; RUBIN, M. I. B.; SILVA, C. A. M. Transporte de oócitos bovinos em meio de maturação sem controle de atmosfera gasosa. *Ciência Rural*, v. 24, n.1, p.219-224, 2004.

LOIOLA, V.G.L.; CHALHOUB, M.; RODRIGUES, A.S. FERRAZ, P.A.; BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L. Validação de um programa de produção *in vitro* de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. *Ciência Animal Brasileira*, v.15, n.1, p.93-101, 2014.

- MARINHO, L. S. R.; UNTURA, R. M.; MOROTTI, F. L.L. MOINO, RIGO, A.G.; SANCHES, B.V.; PONTES, J.H.F.; SENEDA, M.M. Large-scale programs for recipients of in vitro-produced embryos. *Animal Reproduction*, Campinas. v. 9, n. 3, p. 323-328, 2012.
- MAX, M.C. *Produção in vitro de embriões na espécie ovina: efeito do benzoato de estradiol na aspiração folicular e transporte de gametas e embriões em longas distâncias*. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal: Área de Concentração em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, 2006.
- MIRANDA, M.S.; CARVALHO, C.M.F.; CORDEIRO, M.S.; SANTOS, S.S.D.; OHASHI, O.M. Sistemas alternativos de incubação e meios de cultivo para produção in vitro de embrião bovino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.218-223, 2007.
- PONTES, J.H.F. *Aspectos aplicados da produção in vitro de embriões bos indicus*. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2009. 156 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal: Área de Concentração em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, 2009.
- PONTES, J.H.; MELO STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, v.75, p.1640–1646, 2011.
- SAS INSTITUTE INC., *Statistical Analysis System*, Versão 8.0. Cary, NC: 2000. (Manual On-line).
- SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; ANDRADE, E.R. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. *Semina: Ciências Agrárias*. Londrina, v.23, n.1, p.101-110, 2002.
- SIQUEIRA, L. G. B.; FONSECA, J.F.; CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M. Factores que afectan a la fecundación in vitro en bovinos. *Spermova*, Lima, v. 01, p. 10-12, 2012.
- 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. Belo Horizonte*. v. 2, n. 32, p.100-109, 2008.