



SELEÇÃO DE REPRODUTORES BOVINOS DA RAÇA NELORE NA PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES

LIA DE ALENCAR COELHO², CESAR ROBERTO ESPER³, RAFAEL HERRERA ALVAREZ¹,
ROBERTA VANTINI² e IVO LUIZ DE ALMEIDA JUNIOR²

RESUMO: O presente trabalho avaliou o efeito do reprodutor nas taxas de clivagem (TC) e de blastocistos (TBL) com a finalidade de verificar qual desses parâmetros serviria para selecionar o sêmen de reprodutores da raça Nelore para produção *in vitro* (PIV) de embriões. Oócitos imaturos provenientes de ovários de vacas de abatedouro foram submetidos a maturação *in vitro* utilizando o meio TCM 199, acrescido de 10% de soro de vaca em estro (SVE), 5µg/ml de FSH e 5µg/ml de LH. Após 24 h de cultura, os oócitos maduros foram incubados com sêmen descongelado de 4 reprodutores da raça Nelore (A, B, C e D), previamente submetidos ao procedimento de lavagem e a concentração espermática ajustada para 5×10^6 células/ml. A incubação dos oócitos-sêmen teve a duração de 18 a 21 hs e o meio de cultura utilizado foi o TALP-FIV suplementado com 30µg/ml de heparina. Após este período, os oócitos foram transferidos para placas contendo microgotas de meio Ménezo suplementado com 10% de SVE e células epiteliais do oviduto bovino em suspensão, cobertas com óleo de silicone, permanendo em cultura por mais 9 dias. Todas as culturas foram realizadas a 38,5°C em atmosfera com 5% de CO₂ e os dados foram analisados pelo Teste do Quiquadrado. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os reprodutores com relação a TC (A= 61,2%; B= 61,3%; C= 66,1%; D= 64,1%). Com relação a TBL, o reprodutor C (4,1%) foi inferior ($P < 0,05$) aos reprodutores A (10,6%), B (12,1%) e D (18,8%) os quais não diferiram entre si. Estes resultados sugerem que a seleção de reprodutores da raça Nelore para PIV de embriões deve ser realizada utilizando como parâmetro a taxa de blastocistos.

Termos para indexação: fecundação *in vitro*, bovinos, reprodutor, embrião, taxa de clivagem.

SELECTION OF NELORE BULLS ON IN VITRO PRODUCTION OF EMBRYOS

SUMMARY: This study evaluated the bull effect on the cleavage (CR) and blastocyst rate (BLR) by verifying which of these parameters can be used for selection of semen from Nelore bulls by in vitro production (IVP) of embryos. The immature oocytes from slaughterhouse cows ovaries were matured in vitro in TCM 199 medium with 10% estrous cow serum (ECS), 5µg/ml FSH and 5µg/ml LH. After 24 h of culture, the mature oocytes were incubated with frozen-thawed semen from 4 Nelore bulls (A, B, C and D), which were submitted to the washing procedure and the sperm concentration adjusted to 5×10^6 cells/ml. The oocytes-sperm incubation lasted 18-21 h and the TALP-IVF supplemented with 30µg/ml heparin was the culture medium used. After this, the oocytes were transferred into microdroplets of Ménezo medium with 10% ECS and bovine oviduct epithelial cells in suspension and were further cultured by 9 days. All the cultures were performed at 38.5°C with 5% CO₂ in air and the data were analysed by chi-square test. There was no difference ($P > 0.05$) among the bulls regarding to CR (A= 61.2%; B= 61.3%; C= 66.1%; D= 64.1%). In terms of BLR, bull C (4.1%) was significantly different from bulls A (10.6%), B (12.1%) and C (18.8%), which were not different to each other. The results indicated that the selection of bulls for IVP of bovine embryos should be done by using the blastocyst rate as the goal.

¹ Seção de Reprodução e Inseminação Artificial - Instituto de Zootecnia - Rua Heitor Penteado, 56 Nova Odessa - SP CEP 13460-000

² Depto de Reprodução Animal FCAV/JUNESP - Rodovia Carlos Tonanni, km 05 - Jaboticabal - SP CEP 14870-000



Index terms: *in vitro* fertilization, bovine, bull, embryo, cleavage rate.

INTRODUÇÃO

A fecundação *in vitro* (FIV) é uma técnica pela qual oócitos imaturos, recuperados de folículos ovarianos, são submetidos à determinadas condições de cultura *in vitro* para maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário até o estágio de pré-implantação. Essa técnica, também conhecida como produção *in vitro* de embriões, tem sido utilizada para avaliar a alta fertilidade de reprodutores bovinos utilizados em programas de inseminação artificial (MARQUANT LE-GUIENNE et al., 1990; SHAMSUDDIN e LARSSON, 1993; ZHANG et al., 1996). Diversos estudos têm evidenciado que oócitos de bovinos (EYESTONE e FIRST, 1989; HILLARY et al., 1990; SHI et al., 1991; KURTU et al., 1996; SCHNEIDER et al., 1996), de ovinos (FUKUI et al., 1988) e de suínos (XU et al., 1996) fecundados com sêmen de diferentes reprodutores variam em seu potencial de ser penetrado pelo espermatozóide e atingir a primeira clivagem e o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Outros autores ainda ressaltam variações associadas à utilização de diferentes ejaculados do mesmo touro e de diferentes palhetas do mesmo ejaculado (OTOI et al., 1993).

O efeito específico do reprodutor na taxa de fecundação pode ser minimizado ajustando a concentração espermática (EYESTONE e FIRST, 1989; KROETSCH e STUBBINGS, 1992; BRACKETT e KESKINTEPE, 1996). Em contrapartida, a taxa de clivagem de oócitos bovinos fecundados *in vitro* é afetada pelo reprodutor mas não pela concentração espermática (KURTU et al., 1996). Diversos trabalhos têm demonstrado que, independente da concentração espermática, a taxa de clivagem não é afetada pelo reprodutor mas sim, a competência de desenvolvimento embrionário dos oócitos bovinos, traduzida como taxa de mórulas e/ou blastocistos (HILLARY et al., 1990; SHI et al., 1991). Entretanto outros trabalhos têm demonstrado que além da produção de embriões, o reprodutor também afeta a taxa de clivagem (SCHNEIDER et al., 1996).

Variações na taxa de clivagem e na produção de blastocistos em função do reprodutor utilizado também foi observada entre touros zebuínos (QUETGLAS et al., 1994; WATANABE e OLIVEIRA FILHO, 1994; WATANABE et al., 1996; COELHO et al., 1997).

Diante disso, a seleção de reprodutores para serem utilizados na técnica de fecundação *in vitro* de bovinos torna-se uma prática importante para garantia de resultados satisfatórios, e a principal dificuldade reside na escolha do parâmetro a ser considerado nesta seleção: taxa de clivagem ou taxa de blastocistos?

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a utilização do sêmen de diferentes reprodutores da raça Nelore para fecundação *in vitro* de oócitos bovinos maturados e desenvolvidos *in vitro* verificando qual o melhor parâmetro para a seleção destes reprodutores.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos oócitos e maturação *in vitro* (MIV)

Os ovários, colhidos de vacas provenientes de abatedouro, foram transportados para o laboratório, a temperatura ambiente, dentro de frascos de vidros contendo solução salina a 0,9%, acrescidos de sulfato de gentamicina (50 µg/ml) e fungizon (2,5 µg/ml). No laboratório, os ovários foram lavados (2X) com solução salina a 0,9% e mantidos em banho-maria, a 34 - 35°C. Os complexos cumulus-oócitos (COCs), aspirados de folículos de 3-8 mm, foram colocados em placas de Petri (100 mm), contendo meio TCM 199 suplementado com Hepes (25 mM), sulfato de kanamicina (75µg/ml) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (meio H-199). Sob estereoscópio (aumento de 10 a 60X), os COCs foram visualizados, lavados duas vezes em meio H-199, e colocados em cultura por 24 h, a 38,5°C em atmosfera com 5% de CO₂, em meio de maturação.

O meio básico de maturação foi constituído de meio TCM 199, suplementado com aditivos (1 µg/ml de vitamina B₁₂, 10 µg/ml de insulina, 50 µg/ml de álcool polivinil, 75 µg/ml de ácido ascórbico, 5 µg/ml de inositol, 100 µg/ml de acetato de sódio e 200 µg/ml de glicosamina), Hepes (16,79 mM), bicarbonato de sódio (28,57 mM), piruvato de sódio (2,73 mM), sulfato de kanamicina (75µg/ml) e 10% de soro de vaca no estro (meio B-199). Os oócitos (até 200 oócitos) foram colocados em placa de polipropileno (35 mm) contendo 3 ml de meio B-199 com 2,5 ml de meio B-199 com 5µg/ml de FSH e 5µg/ml de LH e mantidos em incubadora com 5% de CO₂, a 38,5° C durante 22 - 24 h.

Preparo do sêmen e fecundação *in vitro* (FIV)

Foi utilizado sêmen congelado de quatro reprodutores (A, B, C e D) da raça Nelore. O sêmen previamente descongelado foi submetido ao procedimento de lavagem com meio TALP, sem cálcio e glicose, suplementado com sulfato de gentamicina (TALP Ca free) (COELHO, 1993) para eliminação do plasma seminal e do diluidor. Ao conteúdo de duas palhetas foi adicionado 5 ml de meio (TALP Ca free e, após duas centrifugações (200 g durante 5 min), o sedimento foi ressuspenso em meio TALP, com



cálcio e sem glicose, suplementado com sulfato de gentamicina (TALP-FIV), com penicilamina, hipotaurina, epinefrina (PHE) e com 30 µg/ml de heparina (TALP-FIV-PHE-H), ajustando-se a concentração espermática para 25×10^6 células/ml. Os oócitos foram retirados do meio de maturação, lavados em meio H-199 sem soro (3X) e posteriormente em meio TALP-FIV, e colocados nas placas de fecundação. A fecundação foi realizada colocando os oócitos (50 a 80) em placas de cultura de 4 escavações, onde cada escavação continha um volume final de 500 µl, formado por 340 µl de meio TALP-FIV-PHE-H; 100 µl de suspensão de sêmen e 60 µl de suspensão de oócitos. A concentração espermática em cada fossa foi de 5×10^6 células/ml. Os oócitos e sêmen foram incubados com 5% de CO₂ a 38,5°C, por um período de 18 a 21 horas.

Cultivo *in vitro* (CIV) e obtenção das células epiteliais do oviduto bovino (CEOB)

Os oócitos supostamente fecundados foram removidos do meio de fecundação, lavados em meio TALP-FIV (2X) e uma vez em meio Ménezo (B2) e transferidos para as placas contendo microgotas de 100 µl de meio B2, suplementado com 10 % de soro de vaca em estro (SVE) e uma suspensão de células epiteliais do oviduto bovino (CEOB), cobertas com óleo de silicone.

As CEOBs foram obtidas após dissecação do oviduto, raspagem e sucessivas lavagens das células em meio H-199. Seguido a última lavagem (meio B-199), o sedimento foi ressuspense em meio B-199 e cultivado "overnight", com 5% de CO₂ em ar a 38,5° C. Seguido vinte e quatro horas, 2 µl de CEOB foi adicionado em cada microgota de desenvolvimento.

Modelo experimental e análise estatística

Os dados referentes as taxas, de clivagem (TC) e de blastocistos (TBL), dos reprodutores A, B, C e D foram analisados pelo Teste do Qui-quadrado (χ^2). A TC foi definida como a porcentagem de oócitos que apresentaram

a primeira divisão celular 48 horas após a inseminação *in vitro* e a TBL foi definida como a porcentagem de blastocistos produzidos a partir dos oócitos inseminados, nos dias 7, 8 e 9 de cultura após a inseminação *in vitro*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença ($P > 0,05$) com relação a taxa de clivagem (TC) quando oócitos bovinos foram fecundados com sêmen de diferentes touros da Raça Nelore. As taxas de clivagem foram 61,2; 61,3; 66,1 e 64,1 % para os reprodutores A, B, C e D, respectivamente (Quadro 1). Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por alguns trabalhos que não evidenciaram efeito do reprodutor na taxa de clivagem (EYESTONE e FIRST, 1989; HILLARY et al., 1990; SHI et al., 1991), mas discordam de KURTU et al. (1996) e BRACKETT e KESKINTEPE (1996) que demonstraram que a taxa de clivagem varia significativamente em função do reprodutor utilizado. A falta de influência do reprodutor na taxa de clivagem pode ter sido decorrente da concentração espermática utilizada (10×10^6 células/ml). KROETSCH e STUBBINGS (1996) verificaram que a taxa de fertilização (determinada pela presença de 2 pronúcleos ou pela descondensação da cabeça do espermatozóide e a presença do pronúcleo feminino) não sofre influência do touro quando a concentração espermática ultrapassa a 10^6 células/ml. Estes resultados sugerem que o efeito do reprodutor na taxa de fertilização pode se tornar insignificante pela utilização de uma concentração espermática elevada. O fato do parâmetro avaliado por KROETSCH e STUBBINGS (1996) ter sido a taxa de fertilização e não a taxa de clivagem (parâmetro avaliado no presente trabalho), não invalida a comparação pois esta última reflete o potencial do oócito fecundado sofrer a primeira divisão celular. Alguns pesquisadores têm mensurado o processo de fertilização por meio da taxa de clivagem (KURTU et al., 1996).

QUADRO 1 - Resultados de clivagem e desenvolvimento *in vitro*, de oócitos bovinos maturados com FSH (5µg/ml) e LH (5µg/ml) e fecundados com sêmen de diferentes touros da Raça Nelore.

Touros	Nº de Ócitos	Clivados (%)	Blastocistos (%)
A (Chaman)	464	284 (61,2) ^a	49 (10,6) ^a
B (Sancho)	124	76 (61,3) ^a	15 (12,1) ^a
C (Hosana)	295	195 (66,1) ^a	12 (4,1) ^b
D (Zero)	64	41 (64,1) ^a	12 (18,8) ^a
TOTAL	947	596 (62,9)	88 (9,6)

Letras diferentes dentro da mesma coluna diferem ($P < 0,05$) pelo Teste χ^2



Além disso, EYESTONE e FIRST (1989) observaram que quando se ajustou a concentração espermática para cada reprodutor produzir taxas de fertilização de 70-80%, não houve influência do reprodutor na taxa de clivagem embora a taxa de mórulas e blastocistos tenha sido significativamente diferente. Estas observações nos leva a seguinte reflexão: embora o efeito do reprodutor sobre a taxa de clivagem tenha sido minimizado pelo ajuste da concentração espermática, o referido efeito ainda foi aparente na taxa de embriões produzidos. Estes resultados coincidem com os obtidos por outros (HILLARY et al., 1990; SHI et al., 1991; SHAMSUDDIN e LARSSON, 1993). Os dados do trabalho mostraram diferença significativa ($P < 0,05$) na taxa de blastocistos, entre os reprodutores testados (Quadro 1 e Figura 1). O reprodutor C apresentou uma produção de embriões (4,1%) inferior ($P < 0,05$) a dos reprodutores A (10,6%), B (12,1%) e D (18,8%), os quais não diferiram ($P > 0,05$) entre si. Evidencia-se assim diferenças na contribuição de cada reprodutor no desenvolvimento embrionário, sendo essas diferenças manifestadas somente após a primeira clivagem.

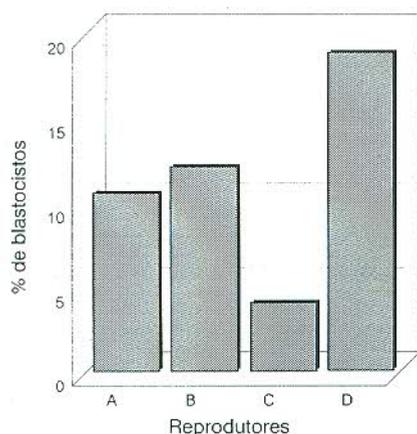


FIGURA 01 - Percentual de blastocistos produzidos *in vitro* a partir da fecundação *in vitro* de oócitos maturados com sêmen de diferentes reprodutores da raça Nelore.

Paradoxalmente, QUETGLAS et al. (1994), utilizando os mesmos reprodutores do trabalho em questão, encontraram efeito do reprodutor na taxa de clivagem mas não na taxa de estruturas transferíveis. Esta discrepância entre os resultados provavelmente se deve às diferentes metodologias utilizadas. Estes autores utilizaram altas concentrações de heparina (100 µg/ml) durante um curto período (15 min), administrada no sedimento espermático, antes de sua ressuspensão em meio de fecundação. Quando este sedimento foi diluído

para ajustar a concentração espermática em 10×10^6 células/ml, a concentração final de heparina variava em função do grau de diluição. Portanto, a concentração de heparina não foi constante entre os reprodutores avaliados e nem entre repetições laboratoriais. Existem evidências, tanto do efeito da concentração de heparina (FUKUI, et al., 1990; GARCIA et al., 1991; SHAMSUDDIN e LARSSON, 1993; SAEKI et al., 1995) como da interação reprodutor e concentração de heparina (MARQUANT LE-GUIENNE et al., 1990; BRACKETT e KESKINTEPE, 1996) nas taxas de fecundação, de clivagem e de embriões.

Algumas pesquisas realizadas com fecundação *in vitro* em zebuínos têm demonstrado que o sêmen desses reprodutores requerem maiores concentrações de heparina (50 µg/ml) para capacitação espermática que os reprodutores taurinos (ESPER et al., 1991; OLIVEIRA FILHO et al., 1994). Contudo, esta diferença parece ter sido circunstancial já que outros trabalhos têm observado que a concentração de heparina poderia variar entre 1 a 100 µg/ml para obtenção de taxas de fecundação (GARCIA et al., 1991), de clivagem e de blastocistos (WATANABE et al., 1993) satisfatórias. Assim como os taurinos, estes últimos autores também encontraram interação entre o efeito do reprodutor, a concentração de heparina e a concentração espermática para zebuínos.

A concentração de heparina utilizada no trabalho em questão foi de 30 µg/ml e mesmo sem um teste prévio de padronização da concentração de heparina para cada reprodutor o efeito do macho foi evidente. Portanto a seleção de reprodutores dentro do sistema de produção *in vitro* de embriões bovinos, independente da raça ou sub-espécie, deve ser realizada em função da concentração espermática utilizando como parâmetro a taxa de blastocistos.

CONCLUSÕES

Nas condições em que o trabalho foi realizado, baseado nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. A utilização de diferentes reprodutores da raça Nelore resultou em diferentes taxas de blastocistos produzidos entre sete e nove dias após a fecundação *in vitro*.
2. A seleção de reprodutores da raça Nelore para serem utilizados na produção *in vitro* de embriões deve ser realizada utilizando como parâmetro a taxa de blastocistos.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRACKETT, B.G., KESKINTEPE, L. Defined sperm treatments and insemination conditions enable improved bovine embryo production *in vitro*. *Theriogenology*, Los Altos, v. 45, n.1, p. 259, 1996.
- COELHO, L.A. *Avaliação da motilidade progressiva e da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de bovinos para fecundação in vitro*. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, 1993. 96 f. Tese de Mestrado.
- _____ et al. Avaliação das condições de maturação oocitária e do efeito do reprodutor na produção *in vitro* de embriões bovinos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 35, p., 1998. (no prelo)
- ESPER, C.R. et al. Fatores que afetam a taxa de fecundação *in vitro* em zebuínos. I- Eliminação do diluidor do sêmen por lavagem versus "swim up". In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., Belo Horizonte, 1991. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991. p. 294.
- EYESTONE, W.H., FIRST, N.L. Variation in bovine embryo development *in vitro* due to bulls. *Theriogenology*, Los Altos, v. 31, n.1, p. 191, 1989.
- FUKUI, Y. et al. Ram-specific effects on *in vitro* fertilization and cleavage of sheep oocytes matured *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, Cambridge, v. 82, n.1, p. 337-340, 1988.
- GARCIA, J.M. et al. Efeitos da dosagem de heparina e concentração espermática na fertilização *in vitro* de oócitos bovinos (*Bos indicus*) maturados *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., Belo Horizonte, 1991. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991. p. 293.
- HILLERY, F.L. et al. Bull specific effect on fertilization and embryo development *in vitro*. *Theriogenology*, Los Altos, v.3, n.1, p. 249, 1990.
- KROETSCH, T.G., STUBBINGS, R.B. Sires and insemination dose does effect *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, Los Altos, v. 37, n.1, p. 240, 1992.
- KURTU, J.M. et al. Cleavage rate of bovine oocytes *in vitro* is affected by bulls but not sperm concentrations. *Theriogenology*, Los Altos, v.45, n.1, p. 257, 1996.
- MARQUANT LE GUIENNE, B. et al. Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization tests. *Reprod. Nut. Dev.*, Paris, v.30, p. 259-266, 1990.
- OLIVEIRA FILHO, E.B. et al. Establishment of an IVF program for zebu cattle (*Bos indicus*) in Brazil. *Theriogenology*, Los Altos, v. 41, n.1, p. 188, 1994.
- OTOI, T. et al. Effects of different lots of semen from the same bull on *in vitro* development of bovine oocytes fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, Los Altos, v. 39, p. 713-718, 1993.
- QUETGLAS, M.D. et al. Variação da capacidade fecundante de touros *Bos indicus* em fecundação *in vitro* e seleção do touro referência. *Zootecnia*, Nova Odessa, v.32 (único), p. 36, 1994.
- SCHNEIDER, C.S. et al. Effects of bulls with different field fertility on *in vitro* embryo cleavage and development using sperm co-culture systems. *Theriogenology*, Los Altos, v.45, n.1, p.262, 1996.
- SHAMSUDDIN, M., LARSSON, B. *In vitro* development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. *Reprod. Dom. Anim.*, Berlin, v. 28, p.77- 84, 1993.
- SHI, D.S. et al. Variation in cleavage and embryonic development of bovine oocytes *in vitro* fertilized with different bull ejaculates. *Theriogenology*, Los Altos, v..5, n.1, p. 271, 1991.
- WATANABE, Y.F., OLIVEIRA FILHO, E.B. Efeito de touros na produção *in vitro* de embriões bovinos. *Zootecnia*, Nova Odessa, v.32 (único), p.35, 1994.
- _____ et al. Desenvolvimento de gestação em bovinos com embriões produzidos em programa de fecundação *in vitro* (FIV). *Ars Veterinária*, Jaboticabal, v. 9, n. 2, p. 191, 1993.
- XU, X. et al. *In vitro* fertilization of *in vitro* matured pig oocytes: effects of boar and ejaculate fraction. *Theriogenology*, Los Altos, v. 45, n.4, p. 745-755, 1996.



ZHANG, B.R. et al. . Ability of intact zona pellucida binding assay to discriminate bulls with different fertility after A.I. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION,13., Sidney, 1996. Proceedings... Sidney: 1996. v. 3, p. 24-25.