

CONTROLE DE QUALIDADE DE NA CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* COM ESPERMATOZÓIDES CENTRIFUGADOS EM GRADIENTE DESCONTÍNUO DE IODIXANOL PARA A SELEÇÃO DO SEXO. Melina Keiko Mizuta; Vera Fernanda M. Hossepian de Lima; Ana Paula Perini – Inter-Áreas - Zootecnia - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp - Câmpus de Jaboticabal.

A partir da década de 80, o aprimoramento e a difusão das técnicas de inseminação artificial e transferência de embriões, dentro dos programas de melhoramento genético animal, bem como a demanda de sistemas de produção mais eficientes, intensificaram o estudo e o desenvolvimento de técnicas de seleção do sexo de espermatozóides e embriões pré-implantados, em espécies de interesse zootécnico. A seleção do sexo tem um valor econômico significativo nos animais de interesse zootécnico com aptidão para produção de leite e carne, em sistemas onde a produtividade é favorecida pela progênie de um dos sexos (TAYLOR *et al.*, 1985; VAN VLECK *et al.*, 1987; RUVUNA *et al.*, 1992; HOHENBOKEN, 1999). Em programas de melhoramento genético bovino, a sexagem de espermatozóides, associada à inseminação artificial ou transferência de embriões, incrementará o progresso genético anual em até 25% para produção de leite e carne (HOHENBOKEN, 1999).

Além dos aspectos médico e zootécnico, deve-se considerar a base científica das técnicas de sexagem que evoluem rapidamente, originando conhecimentos que servirão ao desenvolvimento de métodos mais eficientes. O desenvolvimento e o aprimoramento de técnicas para seleção do sexo, bem como a sua introdução na tecnologia de sêmen ou de embriões, demandam uma abordagem multidisciplinar. Neste sentido é oportuno rever e justificar as rotas tecnológicas para a seleção do sexo e para a congelação de embriões produzidos *in vitro*.

Na produção *in vitro* de embriões o gradiente de densidade de Percoll, pode ser substituído por um gradiente descontínuo de densidade de Iodixanol, poderá melhorar a qualidade dos embriões, desviará a proporção sexual em favor das fêmeas e resolverá o problema da ocorrência de maior produção de embriões do sexo masculino. Nos procedimentos de embriões produzidos *in vitro* a sexagem de espermatozóides poderá ser feita imediatamente antes da fecundação, utilizando-se sêmen congelado dos touros desejados, sem que haja necessidade de se pagar o valor agregado à dose de sêmen sexado, e assim, não onerando o procedimento produção *in vitro* de embriões.

Utilizou-se ovários bovinos coletados em abatedouros, aspirou-se o fluido folicular, onde foi selecionado apenas oócitos de *cumulus* que foram lavados em Piruvato e em meio de maturação B-199. Os oócitos foram maturados por 24 horas em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar, a fecundação foi feita 24 horas após o início do cultivo de maturação. Descongelou-se uma palheta de sêmen à temperatura de 35-37°C por 30 segundos. O sedimento recuperado foi avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. Após fecundação, lavou-se os zigotos três vezes para a remoção total das células do cumulus. A clivagem e o desenvolvimento embrionário foram avaliados 24 horas e 7 dias após a fecundação, respectivamente. Foram puncionados 688 oócitos que foram divididos em dois grupos de 344 oócitos para o grupo controle e para o grupo sexado. Do grupo controle obtivemos 138 embriões e do sexado conseguimos 131 embriões que foram para o cultivo. Obtivemos 45 blastocistos do grupo controle e 36 blastocistos sexados. Os embriões de cada grupo foram congelados, descongelados e submetidos a cultivo. Nenhum deles desenvolveu após cultivo de 72 horas.

A qualidade dos blastocistos bovinos (TOMITA, 2003) produzidos *in vitro* é sempre inferior a daqueles produzidos *in vivo*, e isto foi verificado através deste experimento. A qualidade dos oócitos e as condições de cultivo determinam a taxa de produção e qualidade dos blastocistos após a fecundação e, conseqüentemente, a resistência a congelação (TOMITA, 2003; GASPARRINI, 2003). A suplementação do meio de maturação com cisteína e cisteamina (GASPARRINI *et al.*, 2003) ou precursores da glutatona aumentam a síntese de GSH que, por sua vez, protege as células do estresse oxidativo, prejudicial ao desenvolvimento *in vitro* de embriões (revisto por GASPARRINI, 2004).

O metabolismo aeróbico inevitavelmente leva a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) como superóxido e peróxido de hidrogênio. As técnicas de produção *in vitro* expõem os embriões, os quais não se beneficiam da proteção antioxidante maternal: a atmosfera de 20% de oxigênio ao invés de aproximadamente 7% (como no oviduto), luz e traços de metal pesado no meio de cultura. Todos

estes fatores são responsáveis por um aumento na produção de ROS os quais podem ter efeitos deletérios nos embriões.

Da mesma forma, a existência de diferenças na quantidade de transcritos de alguns genes importantes no processo de desenvolvimento (dependente das condições de cultivo) pode explicar a diferente qualidade e criotolerância, entre os embriões produzidos in vivo e in vitro. Assim, a qualidade dos oócitos, o número de embriões cultivados em um determinado volume de meio de cultura alteram a expressão de genes importantes para o estabelecimento da prenhez como o interferon-tau.

Referências bibliográficas:

GASPARRINI, B.; SAYOUD, H.; NEGLIA, G.; DE MATOS, D.G.; DONNAY, I.; ZICARELLI, L. Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. **Theriogenology**, v. 60, p. 943-952, 2003.

HOHENBOKEN, W.D. Applications of sexed semen in cattle production. **Theriogenology**, v. 52, p. 1421-1433, 1999.

RUUVUNA, F.; TAYLOR, J.F.; WALTER, J.P.; TURNER, J.W. Bioeconomic evaluation of embryo transfer in beef production systems: III. Embryo lines production bulls. **J. Anim. Sci.**, v. 70, p. 1091-1097, 1992.

TAYLOR, C.S. Food efficiency in tradicional and Sex controlled systems of beef production. **Anim. Prod.**, v. 40, p. 401- 440, 1985.

VAN VLECK, L.D.; JOHN POLLAK, E.; BRANDFORD-OLTENACU, E.A. **Genetics for the Animal Science**. New York: W.H. Freeman, 1987. cap.13, p.287-313.

TOMITA, S. Y. **Viabilidade prática e custo da indução de gestações gemelares em bovinos de corte, a partir de embriões produzidos in vitro e criopreservados para transferência direta**. 70 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

Bolsa: Pibic/CNPq