

PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS COM SUPLEMENTO ANTIOXIDANTE SIGMA[®]

Mateus José Sudano, Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, Maria Clara Mattos – Ciências da Vida – Medicina Veterinária - Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus Botucatu.

Nos últimos tempos a produção de embriões *in vitro* (PIV) tem se difundido amplamente entre os criadores de bovinos de elite, com maior ênfase na raça Nelore, o grande patrimônio genético nacional. Esta técnica trouxe uma velocidade significativa à pressão da seleção genética, e sendo utilizada de maneira consciente se tornará uma ferramenta de grande valia a pecuária nacional. As principais etapas que a constituem são: maturação, fertilização e o cultivo que ainda necessitam de estudos para uma melhoria e padronização dos índices obtidos hoje.

O cultivo *in vitro* de embriões bovinos derivados de maturação *in vitro* (MIV)-fertilização *in vitro* (FIV) tem obtido sucesso na produção de bezerros. Um sistema de cultivo adequado para zigotos bovinos é requerido para uma produção em larga escala de embriões *in vitro*, para o melhoramento genético e para a aplicação de outras biotécnicas, como transferência nuclear, clonagem entre outras.

Zigotos bovinos derivados de MIV-FIV tem sido cultivados em presença de células somáticas ou em meios parcial ou totalmente definidos. Mas existem muitas diferenças entre embriões bovinos produzidos *in vitro* daqueles produzidos *in vivo*. Foi relatado que embriões produzidos *in vitro* apresentam um citoplasma mais escuro e de menor densidade. Uma das principais diferenças entre os embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* é a concentração de oxigênio no ambiente que envolve o embrião. Admite-se que *in vivo* a concentração de oxigênio é de cerca de 3 -9%, já *in vitro* os embriões podem ser cultivados em ambientes com concentrações de 5 a 20% de oxigênio. Desta forma embriões cultivados *in vitro* estão expostos, com frequência, a um aumento na concentração de espécies oxigênio reativas (ROS), o qual é coincidente com o bloqueio no desenvolvimento.

Durante o início de seu desenvolvimento, no oviduto, os embriões estão protegidos dos danos causados pelo ROS por agentes anti-oxidantes presentes no fluido da tuba uterina. No entanto, quando os ovócitos ou embriões são removidos de seu ambiente natural para utilização em técnicas de reprodução assistida, este mecanismo de defesa é perdido. Sendo assim, para otimizar os sistemas de PIV de embriões, com frequência são adicionados anti-oxidantes ao meio de cultivo embrionário. Apesar disso os efeitos da adição de agentes anti-oxidantes em sistemas de cultivo ainda não são totalmente conhecidos em virtude da constatação de oscilações nos resultados de um sistema para outro.

Desta forma este trabalho tem como objetivo estudar a adição de substâncias anti-oxidantes, contidas no suplemento antioxidante da Sigma (A-1345), ao meio de cultivo de embriões bovinos em sistema com alta e baixa concentração de O₂.

Sendo assim, ovários de abatedouros foram utilizados para a obtenção dos ovócitos. Os folículos com diâmetro entre 2 a 8 mm foram aspirados e os ovócitos obtidos foram selecionados de acordo com a qualidade, ou seja, foram utilizados somente aqueles que apresentem três ou mais camadas compactas de células do *cumulus*.

Os ovócitos selecionados foram maturados em estufa a 38, 5° C, com 5% de CO₂ em ar, por 22 a 24 horas. Foi utilizado o meio TCM 199 com sais de Earle e L-glutamina suplementado com 6% BSA, 10% SFB, 2,2 mg/ml piruvato de sódio, 1mg/ml estradiol 17β (E₂ – Sigma, Saint Louis, EUA, # E 2758), 50µg/ml hCG (Profasi[®] 5.000UI), 5µg/ml FSH (Foltropin-V[®], Vetrepharm, Ontário, Canadá), e 75µg/ml gentamicina.

Após a maturação, os ovócitos foram submetidos à fertilização *in vitro* (FIV). Os espermatozóides foram selecionados pelo método do *swim up* e a concentração ajustada para 1x10⁶ espermatozóides/ ml. A fertilização ocorreu em meio Fert-talp, onde os ovócitos e espermatozóides foram incubados em estufa, sob as mesmas condições, por aproximadamente 18 horas.

Decorridas às 18 horas de FIV, os possíveis zigotos foram desnudados e transferidos para as placas de cultivo, divididos em grupos distintos:

Grupo 1: HTF: BME acrescido de 6% de BSA, 10% SFB, 0,01% de myoinositol, 75µg/ml de gentamicina e 1µl/ml de suplemento antioxidante da Sigma (A-1345). Os embriões foram cultivados por sete dias, em estufa a 38, 5° C. Foi utilizada atmosfera com 5% de CO₂ em ar (20% de O₂).

Grupo 2: HTF: BME acrescido de 6% de BSA, 10% SFB, 0,01% de myoinositol, 5µg/ml de gentamicina e 1µl/ml de suplemento antioxidante da Sigma (A-1345). Os embriões foram cultivados por sete dias, em estufa a 38, 5° C e atmosfera 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% N₂ (5% de O₂).

Grupo controle : HTF: BME acrescido de 6% de BSA, 10% SFB, 0,01% de myoinositol e 75µg/ml de gentamicina em atmosfera com 5% de CO₂ em ar (metodologia de rotina no laboratório).

A taxa de blastocistos e o número de células dos blastocistos foram calculados ao término do período de cultivo.

Tabela 1: Dados de produção de blastocistos no 7º dia de cultivo

Grupos	Nº ovócitos	Nº de blastocistos no dia 7	% de blastocistos
1	234	80	34,1 ^a
2	275	98	35,6 ^a
Controle	220	65	29,5 ^b

^{a,b} valores com sobrescritos diferentes na mesma coluna diferem (teste T. P>0.05)

Os resultados obtidos no presente trabalho (tabela 1) demonstram que a adição do suplemento antioxidante foi benéfica para a produção de um maior índice de blastocistos independente da concentração de O₂ utilizada, ou seja, Grupo 1 (34.1%) e Grupo 2 (35.6%) comparados com o Grupo controle (29.5%). A taxa de produção de blastocisto foi significativamente mais alto no grupo cultivado com 5% de O₂ (Grupo 2) em comparação com o grupo controle. Por outro lado, a adição do antioxidante parece ter sido particularmente importante para o Grupo 1 (20% O₂), resultando em uma produção de blastocistos significativamente maior que a observada no grupo controle e equivalente a do Grupo 2. O número médio de núcleos contados nos blastocistos e nas mórulas analisadas foi de 87 e 37 respectivamente. Não foram observadas diferenças entre os grupos com relação à porcentagem de células mortas, as quais apareceram em baixo número, não ultrapassando os 10%. De acordo com os resultados obtidos neste experimento, pode-se concluir que a utilização de uma atmosfera com baixa concentração de O₂ associada à adição de antioxidantes ao meio de cultivo se mostrou benéfica à produção de embriões bovinos *in vitro*. No entanto, a simples adição do suplemento oxidante parece ser suficiente para a melhora das condições de cultivo, mesmo em situações com alta concentração de O₂.

Referências Bibliográficas

- A. Van Soom, Y.Q. Yuan, L.J. Peelman, D.G. de Matos, J. Dewulf, H. Laevens, A de Kruif. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. *Theriogenology* 2002; 57:1453-1465.
- A.A. Ali, J.F. Bilodeau, M.A. Sirard. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology* 2003; 59:939-949.
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN. Presence of β-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured *in vitro* and the rate of blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 1998; 50:747-756.
- Blondin P, Coen K, Sirard M-A. The impact of reactive oxygen species on bovine fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl* 1997; 18:454-60.
- Comporti M. Three models of free radical induced cell injury. *Chem Biol Interact* 1989; 72:1-56.
- de Lamarinde E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997; 2:48-54.

- de Matos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development effect of beta-mercaptoethanol cysteine and cystine. *Theriogenology* 2000; 53:761-71.
- de Matos DG, Gasparrini B, Furnus CC, Thompson JG. Glutathione synthesis during maturation of ovine oocytes: Effects of cysteamine and β -mercaptoethanol. *Theriogenology* 1999; 50:368 abstr..
- Feugang JM, Roover RD, Moens A, Léonard S, Dessy F, Donnay I. Addition of β -mercaptoethanol or Trolox® at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidants agents. *Theriogenology* 2004; 61:71-90.
- Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 1999; 18:7719-70.
- Goto K, Noda Y, Mori T, Nakano M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. *Free Radicals Biol Med* 1993; 15:69-75.
- Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 2001; 7:175-89.
- H. Iawata, S. Akamatsu, N. Minami, M. Yamada. Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. *Theriogenology* 1999; 50: 365-375.
- Johnson MH, Nasr-Esfahani MH. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? *BioEssays* 1994; 16:31-8.
- Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* development ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 2004 (article in press).
- Liu Z, Foote RH. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol Reprod* 1995; 53:786-90.
- Mastrianni Jr L, Jones R. Oxygen tensions in the rabbit fallopian tube. *J Reprod Fertil* 1965; 9:99-102.
- Meister A. Selective modification of glutathione metabolism *Science* 1983; 220:472-7.
- Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.
- Olson SE, Seidel Jr GE. Culture of *in vitro*-produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. *Biol Reprod* 2000; 62:248-52.
- P. Lonergan, M. O. Kearney-Flynn, M. P. Boland. Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology* 1999; 51: 1565-1576.
- Xia Wang, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertility and Sterility* 2002; n.6; 78:1272-77.

Bolsa: Fapesp