



IV ENCONTRO INTERNACIONAL DE BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL:

AVANÇOS E TENDÊNCIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA SAÚDE HUMANA E ANIMAL

AVALIAÇÃO DA TAXA DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE MÓRULAS PARA O ESTABELECIMENTO DE UM PROGRAMA DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES OVINOS

Ney Rômulo de Oliveira Paula^{1,4}; Letícia Soares de Araújo Teixeira²; Francisca Kelly dos Santos Silva³; Jefferson Ribeiro Bezerra³; André Luiz Nogueira de Medeiros³; Cristiane Clemente de Mello Salgueiro⁴; Janaina de Fátima Saraiva Cardoso^{1,4}; José Ferreira Nunes⁴; Rômulo José Vieira⁴

¹Docente do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Teresina-PI; ²Pós-graduanda em Reprodução Animal, Programa de Pós-graduação em Zootecnia Tropical, Teresina-PI; ³Pós-graduanda em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Teresina-PI; ⁴Docente do Programa Profissional de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal, Fortaleza-CE/Teresina-PI.

neyromulo@ufpi.edu.br

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões compreende as etapas de maturação *in vitro* dos oócitos (MIV), capacitação espermática, fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) dos zigotos até o estágio de mórula ou blastocisto. Nesse contexto, objetivou-se avaliar a taxa de desenvolvimento embrionário de mórulas na produção *in vitro* de embriões ovinos. Para tanto, ovários de abatedouros foram colhidos e manipulados em laboratório, visando a obtenção dos complexos *cumulus* oócitos (CCO's), por meio de aspiração folicular e fatiamento (*slicing*) dos ovários. Em seguida, essas estruturas foram selecionadas, classificadas e submetidas ao processo de maturação *in vitro*. Posteriormente, os CCO's maturados foram submetidos ao co-cultivo com células espermáticas (fertilização *in vitro*). Após o período de fertilização *in vitro*, os presumíveis zigotos foram submetidos ao cultivo embrionário *in vitro*. Durante o cultivo embrionário as estruturas foram avaliadas, buscando a identificação de mórulas. De um total de 400 CCO's submetidos a maturação *in vitro*, 370 CCO's (92,5%) maturaram e 270 (73%) estruturas apresentaram clivagem após fertilização *in vitro* e destes obteve-se um total de 260 (96,3%) mórulas. Diante dos resultados obtidos, conclui-se que a produção *in vitro* de embriões ovinos é viável e apresenta resultados promissores.

PALAVRAS-CHAVES: Ovino; Cultivo embrionário; Mórula.

1 INTRODUÇÃO

Por volta da década de 80, foram obtidos os primeiros embriões oriundos da fertilização *in vitro* de oócitos maturados *in vitro*. Alguns anos após, foi relatado o nascimento do primeiro cordeiro obtido após maturação, fecundação e cultivo *in vitro* (CIV) até o estágio de mórula (ROCHA-FRIGONI et al., 2014).

Com o passar dos anos verificou-se que a produção *in vitro* (PIV) de embriões permite acelerar o melhoramento genético devido ao aumento do número de descendentes de uma fêmea com alto mérito zootécnico. Essa biotécnica reprodutiva tem crescido com o avanço das pesquisas, especialmente nas espécies de pequenos ruminantes, pois diferindo da espécie bovina, os caprinos e ovinos apresentam exigências maiores na manipulação *in vitro* (BEZERRA et al., 2014).

Para tanto, é importante uma compreensão das exigências metabólicas e fisiológicas dos oócitos e dos espermatozoides para a obtenção de boas taxas de maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e conseqüentemente cultivo *in vitro* (CIV). Apesar dos avanços já alcançados pesquisas adicionais são necessárias, visando o desenvolvimento de condições ideais para a MIV de oócitos ovinos a fim de que adquiram capacidade meiótica e estejam aptos à fecundação e desenvolvimento embrionário subsequente (SOUZA-FABIAN, 2014).

Vale ressaltar que a produção *in vitro* de embriões ovinos, além de ser uma fonte de embriões para pesquisas básicas de biologia e fisiologia do desenvolvimento, possui excelente potencial para a produção de clones e animais transgênicos (BERNARDI, 2005).

2 OBJETIVO

Visando a implementação na rotina prática da biotecnologia reprodutiva, a produção *in vitro* de embriões ovinos, objetivou-se, por meio deste estudo, avaliar a taxa de desenvolvimento embrionário de mórulas na PIV de embriões ovinos.

3 MATERIAIS E MÉTODO

Os ovários de ovelhas foram colhidos em abatedouros localizados no município de Teresina, PI. Na colheita obteve-se um total de 60 ovários oriundos de 30 ovelhas púberes sem padrão racial definido. Ao chegar no laboratório (Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal/CCA/UFPI) os ovários foram manipulados, visando a obtenção dos complexos *cumulus* oócitos (CCO's) pelas técnicas de aspiração folicular e fatiamento ovariano (*slicing*). Os CCO's obtidos foram classificados quanto ao grau de qualidade morfológica (grau I, II, III e IV) e selecionados para a etapa de maturação *in vitro* (MIV). A maturação *in vitro* ocorreu em meio de MIV contendo TCM 199 suplementado com piruvato, bicarbonato, FSH, LH, estradiol (E2) e 10% de soro fetal bovino em incubadora com atmosfera e umidade controladas a 38,5 °C, com 5% de CO₂ medicinal (grau USP), sob óleo mineral estéril, durante 24 horas.

Ao término da etapa de maturação *in vitro*, procedeu-se a avaliação dos CCO's quanto a extrusão do primeiro corpúsculo polar, evidenciando a retomada da meiose I, início da meiose II e parada na fase de metáfase II. Nesse estágio nuclear o complexo *cumulus* oócitos está apto a ser fertilizado.

Seguidamente, os CCO's maturados (aqueles que apresentaram extrusão do primeiro corpúsculo polar) foram submetidos a etapa de fertilização *in vitro* (FIV). A fertilização foi realizada, utilizando sêmen congelado/descongelado, o qual foi previamente centrifugado em meio Percoll para separação dos espermatozoides viáveis. Em seguida, foi realizada a inseminação das gostas de meio FIV contendo os CCO's maturados. A fertilização *in vitro* ocorreu em meio específico de FIV suplementado com SOF, bicarbonato, 10% de soro de ovelha em estro, Tyrode's (TALP), hipotaurina e glutatona em incubadora com atmosfera e umidade controladas a 38,5 °C, com 5% de CO₂ medicinal (grau USP), sob óleo mineral estéreo, durante 18 horas.

Os presumíveis zigotos obtidos a partir da fertilização *in vitro* foram levemente desnudados para remoção de células do *cumulus* que ainda estavam presentes e avaliados para identificação das primeiras clivagens ou segmentações. A cultivo *in vitro* foi realizado utilizando-se meio específico para essa finalidade contendo fluído sintético de oviduto (SOF) suplementado com albumina sérica bovina (BSA), aminoácidos essenciais e não essenciais em mini-estufa (WTA) com atmosfera e umidade controladas a 38,5°C, 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, sob óleo mineral estéreo, durante sete dias.

Durante o cultivo *in vitro* foi realizado o acompanhamento do desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto. Os embriões foram avaliados quanto a morfologia em estereomicroscópio no aumento de 40x. O objetivo da avaliação morfológica foi a identificação de mórulas.

Os resultados foram expressos na forma de percentual.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 400 complexos *cumulus* oócitos (CCO's) submetidos a maturação *in vitro*, 370 CCO's (92,5%) maturaram, 270 (73%) estruturas apresentaram clivagem inicial após fertilização *in vitro* e destes obteve-se um total de 260 (96,3%) mórulas no cultivo *in vitro*. Dos 370 CCO's submetidos a maturação *in vitro*, 100 (27%) não apresentaram sinais de início de clivagem e das estruturas clivadas apenas 10 (3,7%) não desenvolveram até o estágio de mórula.

Resultados semelhantes ao deste estudo foram encontrados nos trabalhos desenvolvidos por Moawad et al. (2018) e Sanaei et al. (2018), os quais realizaram a produção *in vitro* de embriões ovinos e obtiveram taxas satisfatórias no desenvolvimento embrionário de mórulas durante o cultivo *in vitro*. Vale ressaltar que nos estudos supracitados as mórulas obtidas no cultivo embrionário são oriundas de oócitos que passaram pelo processo de criopreservação.

Ademais, em pesquisa realizada por Romão et al. (2013), utilizando oócitos criopreservados de ovelhas por meio de duas técnicas diferentes e depois submetidos as etapas de produção *in vitro* de embriões, obteve resultados satisfatórios no desenvolvimento embrionário. Isso demonstra a

otimização dessa biotecnologia aplicada a espécie ovina, a qual, hoje, pode ser utilizada como uma importante ferramenta para o melhoramento genético de rebanhos ovinos.

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que a produção *in vitro* de embriões ovinos é perfeitamente viável e apresenta resultados promissores. Dessa forma, essa biotecnologia reprodutiva pode ser implementada na rotina em laboratórios, a fim de fornecer aos criadores de ovinos uma alternativa para o melhoramento genético do rebanho. Ressalta-se ainda esta pesquisa é inédita no estado do Piauí.

REFERÊNCIAS

- BERNADI, M. L. Produção *in vitro* de embriões ovinos. Acta Scientiae Veterinariae. Porto Alegre, v. 33, n. 1, p. 1-16, 2005.
- BEZERRA, F. Q. G.; SILVA, J. C. F.; SILVA, P. G. C.; CANTANHÊDE, L. F.; BASTO, S. R. L.; FREITAS NETO, L. M.; MOURA, M. T.; LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A. L. Produção *in vitro* de embriões ovinos a partir de oócitos coletados durante os períodos seco e chuvoso. Revista de Medicina Veterinária, Recife, v. 8, n. 3, p. 17-23, 2014.
- ROCHA-FRIGONI, N.A.S.; LEÃO, B.C.S.; FELICIANO, M.A.R.; VICENTE, W.R.R.; OLIVEIRA, M.E.F. Produção *in vitro* de embriões ovinos: avanços e desafios. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v. 38, n. 2, p. 103-109, 2014.
- ROMÃO, R.; MARQUES, C.C.; BAPTISTA, M.C.; VASQUES, M.I.; BARBAS, J.P.; HORTA, A.E.M.; CAROLINO, N.; BETTENCOURT, E.; PLANCHA, C.; RODRIGUES, P.; PEREIRA, R.M. Evaluation of two methods of *in vitro* production of ovine embryos using fresh or cryopreserved sêmen. Small Rumin Res 2013; 110: 36-41.
- MOAWAD, A. R.; CHOI, I.; ZHU, J.; EL-WISHY, A. B. A.; AMARNATH, D.; CHEN, W.; CAMPBELL, K. H. S. Caffeine and oocyte vitrification: Sheep as an animal model. International Journal of Veterinary Science and Medicine, v. 6, p. s41-s48, 2018.
- SANAEL, B.; MOVAGHAR, B.; VALOJERDI, M. R.; EBRAHIMI, B.; BAZRGAR, M.; JAFARPOUR, F.; NASR-ESFAHANI, M. H. An improved method for vitrification of *in vitro* matured ovine oocytes; beneficial effects of Ethylene Glycol Tetraacetic acid, an intracellular calcium chelator. Cryobiology, v. 84, p. 82-90, 2018.
- SOUZA-FABJAN, J. M.; PANNEAU, B.; DUFFARD, N.; LOCATELLI, Y.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J.; MERMILLOD, P. *In vitro* production of small ruminant embryos: late improvements and further research. Theriogenology, v. 81, n. 9, p. 1149-1162, 2014.

