

Salles, H. O.¹, Oliveira, R. R. de² & Rumpf, R.²

¹EMBRAPA-caprinos, CxP D-10, 62011-970, Sobral-CE, ²EMBRAPA-recursos genéticos e biotecnologia, CxP 0232, 70770-900, Brasília-DF, e-mail: hevila@cnpc.embrapa.br

Introdução: Embora a fecundação *in vitro* em bovinos venha propiciando bons resultados, para melhor entendimento dos mecanismos estruturais e moleculares do processo, técnicas de micromanipulação de gametas podem permitir maior controle das etapas envolvidas, bem como vencer os problemas relacionados com a fusão entre esses, possibilitando ou aumentando a taxa de fecundação em animais com infertilidade congênita ou adquirida. Nesse sentido, várias técnicas de micromanipulação foram desenvolvidas objetivando a fecundação. No entanto, foi com a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) que se obteve o maior avanço no campo da reprodução assistida, tornando-se possível ultrapassar as barreiras normais para fecundação apresentadas pela zona pelúcida e membrana plasmática. Em mamíferos, o primeiro sucesso de fecundação de ovócito após injeção intracitoplasmática de espermatozóide foi reportada em hamster por UEHARA & YANAGIMACHI (1976). Em bovinos, foram GOTO et al. (1990) que obtiveram o primeiro bezerro produzido após ICSI, embora WESTHUSIN et al. (1984) já houvessem obtido formação de pró-núcleo em ovócitos após injeção de espermatozóide. Desde então, estudos têm sido realizados no sentido de melhorar as porcentagens de fecundação, clivagem, formação de blastocistos, prenhez e nascimento das estruturas obtidas nas diferentes espécies. No entanto, a ICSI tem tido um sucesso limitado nos animais domésticos quando comparada aos resultados em humanos (CATT & RHODES, 1995). O que demonstra que a existência de diferenças entre as espécies determina a tolerância do ovócito à injeção do espermatozóide e a capacidade do espermatozóide fecundar e ativar o ovócito, resultando em clivagem e desenvolvimento embrionário. **Objetivo:** Nesse contexto, objetivou-se com o presente trabalho, determinar, em ovócitos de bovino, o melhor tempo de cultivo *in vitro* para a realização da ICSI com base na taxa de fecundação obtida. **Metodologia:** Folículos entre 2 e 8 mm foram puncionados de ovários obtidos em abatedouro comercial e os ovócitos selecionados quanto a homogeneidade do citoplasma e o número de camadas do cumulus e, cultivados em estufa a 39°C e a 5,0% de CO₂ em ar, sob alta umidade em TCM-199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, FSH (10 mg/mL), LH (24UI/mL) e gentamicina (0,005 mg/mL). Após 22 h de cultivo, todos os ovócitos foram desnudados com hialuronidase (1 mg/mL) em vórtex por três minutos e pipetagens sucessivas, se necessário, seguindo avaliação quanto à presença do primeiro corpúsculo polar. Os ovócitos maduros após 22 h foram destinados à ICSI ou retornavam ao cultivo até completar 24 ou 28 h de cultivo total, para só então serem submetidos à ICSI. Em um grupo de ovócitos maduros por 22 h e cultivado até 24 h simulou-se a ICSI, funcionando como grupo controle. Os espermatozóides destinados a ICSI foram selecionados após descongelação, centrifugação em gradientes de Percoll (90/45) e *swim-up*. Somente espermatozóides móveis em TCM199-Hepes com polivinilpirrolidone a 10% foram injetados. Todos os ovócitos microinjetados ou não (controle), foram ativados com 50 M de cálcio ionóforo (A23187) por 10 min, seguindo bloqueio da ativação com albumina sérica bovina (6mg/mL) e co-cultivo com células da granulosa em TCM-199. Entre 18-22 h da ativação todas as estruturas trabalhadas foram fixadas em ácido acético:etanol (1:3) por, no mínimo, 24 h e avaliadas em contraste de fase após coloração com lacmóide a 1% em ácido acético a 45%. Considerou-se ovócitos ativados os que apresentavam um ou mais pró-núcleos femininos e ovócitos fecundados os que apresentavam dois pró-núcleos, um masculino e outro feminino, e o segundo corpúsculo polar. **Resultados:** A taxa de ativação observada após ICSI às 22, 24 e 28 h de cultivo e no grupo controle foram, respectivamente, 48,28% (28/58), 40% (26/65),

32,77% (38/72) e 56,82% (25/44), não diferindo entre os grupos ($P>0,05$). A taxa de fecundação obtida foi de 10,34% (6/58), 10,77% (7/65) e 8,33% (6/72), respectivamente, para ICSI às 22, 24 e 28 hs de cultivo, também não diferindo entre os grupos ($P>0,05$). **Conclusão:** Ovócitos maduros

(Metáfase II) por 22 h são capazes de descondensar a cabeça do espermatozóide e transformá-la em pró-núcleo, mostrando ser desnecessário para obtenção de uma maior taxa de fecundação após ICSI cultivar ovócitos maduros por um período superior à 22 h.