

DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS EM DIFERENTES SISTEMAS DE CO-CULTIVO.

Dode, M.A.N.; Rodovalho, N.C.M.; Ferreira, C.B.

Embrapa Gado de Corte, Caixa Postal 154, 79002-970, Campo Grande, MS.

Na produção *in vitro* de embriões a co-cultura com células somáticas tem sido rotineiramente utilizada com o objetivo de melhorar o desenvolvimento embrionário e aumentar as taxas de blastocisto. O efeito benéfico da presença destas células durante o cultivo tem sido atribuído a produção de fatores mitogênicos, fatores que proporcionam a diferenciação embrionária e /ou fatores que retiram do meio substâncias tóxicas aos embriões. Vários tipos de células têm sido utilizadas, incluindo cultura primária de células do oviduto ou do cumulus, e de células de inha, como a BRL e a VERO. As células do oviduto são as mais utilizadas, entretanto seu uso depende de acesso a frigoríficos para coleta de ovidutos. O seu preparo é trabalhoso e demorado, além de serem influenciadas pelo estágio do ciclo estral do animal no momento da coleta. As células do cumulus apresentam várias vantagens em relação às do oviduto, pois já estão presentes nos complexos cumulus-oócitos (COC) quando estes são utilizados para maturação e não necessitam ter sua cultura estabilizada. O objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de formação de blastocisto após o co-cultivo com células do oviduto e da granulosa. Ovários de fêmeas Nelore foram coletados em frigorífico, logo após o abate dos animais, e os folículos de 3-5mm de diâmetro foram aspirados com auxílio de uma bomba de vácuo. Os complexos COCs obtidos foram selecionados e maturados *in vitro* por 24 horas. O meio de maturação utilizado foi TCM-199 suplementado com 10% de SFB, LH, FSH e antibióticos. Após maturação, os oócitos foram submetidos à fecundação "*in vitro*". Para a fecundação usou-se sêmen de um mesmo animal e mesma partida que foi separado pelo método do percol e os espermatozoides adicionados à gota de fecundação (TALP-FIV) a uma concentração de $1,6 \times 10^6$ /ml. Dezoito horas após a inseminação os zigotos foram lavados e transferidos para os diferentes grupos de cultivo. No grupo 1 (G1), os zigotos foram desnudados e transferidos para o meio de cultivo na presença com células do oviduto em suspensão. Essas células foram obtidas pela lavagem da luz de ovidutos bovinos. No grupo 2 (G2) os zigotos foram desnudados e cultivados na presença de células da granulosa. Essas células foram obtidas da gota de maturação após a transferência dos oócitos para a gota de fecundação. No terceiro grupo (G3), os zigotos foram transferidos para o meio de cultivo sem a presença de células adicionais. Neste caso os zigotos não foram desnudados, mas apenas lavados e o co-cultivo foi realizado somente com as células da granulosa que permaneceram ligadas aos zigotos, após a fecundação. Em todos os grupos os embriões permaneceram no cultivo por um período de 7 dias, após a inseminação. Os embriões foram avaliados no segundo dia para determinação da clivagem e no sétimo dia para determinação de mórula e blastocisto. Os dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado. As taxas de clivagem foram semelhantes ($p > 0,05$) para todos os tratamentos sendo de 63,1%, 67,5% e 73,4 % para os grupos G1 (n=92), G2 (n=80) e G3 (n=90), respectivamente. As taxas de mórula/blastocisto foram de 24,1% para o G1, 27,8% para G2 e 21,2 % para G3, não havendo diferença entre os grupos ($p > 0,05$). Os resultados sugerem que as células do cumulus proporcionam desenvolvimento embrionário semelhante às do oviduto, podendo, portanto serem utilizadas para o cultivo *in vitro*.