EFEITO DE CÉLULAS SOMÁTICAS E SORO, EM CO-CULTURA, NO DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS FECUNDADOS "IN VITRO"

LUIZ S. A CAMARGO^{1,2}; WANDERLEI F. SÁ¹; ADEMIR M. FERREIRA¹; JOÃO H.M. VIANA³; JOSÉ VALENTE¹

¹ Embrapa Gado de Leite. Rua Eugênio do Nascimento, 610. Dom Bosco, Juiz de Fora, MG, CEP 36038-330

² camargo@cnpq.embrapa.br

³ Doutorando. Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, MG

RESUMO: Foram realizados dois experimentos em que se estudou o efeito das células da granulosa ou da tuba uterina para a co-cultura (Exp. 1) e do soro de vaca em cio ou do soro fetal bovino, ambos com células da granulosa (Exp. 2), sobre o cultivo "in vitro" de embriões bovinos. Os ovócitos maturados e fecundados "in vitro" foram divididos aleatoriamente nos tratamentos. Avaliou-se a taxa de clivagem, produção de blastocistos e blastocistos eclodidos. Não se observou diferença entre os tratamentos ($P>0,05$) para ambos os experimentos. Conclui-se que as células da granulosa e da tuba uterina possuem efeito semelhante sobre o desenvolvimento embrionário, assim como o soro de vaca em cio e soro fetal bovino, quando em co-cultura.

PALAVRAS-CHAVE: bovinos, cultivo "in vitro", soro, células somáticas.

SOMATIC CELLS AND SERUM IN CO-CULTURE ON THE DEVELOPMENT OF IN VITRO FERTILIZED BOVINE EMBRYOS

ABSTRACT: Two experiments were carried out to study the effect of granulosa cells or oviductal epithelial cells (Exp. 1) and estrous cow serum or fetal calf serum, both in granulosa cells (Exp. 2), in vitro embryo development. Bovine oocytes were "in vitro" matured and fertilized and randomly divided in the treatments. It was evaluated cleavage, blastocyst production and hatched blastocysts rate. No difference was observed between treatments ($P>0.05$) for both experiments. The results showed that granulosa cells and oviductal epithelial cells had the same effect on the "in vitro" embryo development, as while estrous cow serum and fetal calf serum, when in co-culture.

KEYWORDS: cattle, "in vitro" culture, serum, somatic cells.

INTRODUÇÃO

Entre os sistemas de cultivo "in vitro" de embriões bovinos existentes, o mais utilizado tem sido o da co-cultura de células somáticas, principalmente com células da tuba uterina ou da granulosa (MARQUANT-LE GUIENNE & HUMBLLOT, 1998), adicionado de soro fetal bovino ou de vaca em cio (GALLI & LAZZARI, 1996). Presume-se que a co-cultura e soro favoreçam o desenvolvimento dos zigotos recém-fecundados até o estágio de blastocisto (BAVISTER, 1995). Entretanto, a diferença entre esses tipos de células ou soro sobre o desenvolvimento embrionário em bovinos não é bem conhecida. O objetivo desse trabalho foi verificar o efeito do tipo de célula somática e do tipo de soro, ambos em sistema de co-cultura, sobre o desenvolvimento embrionário de zigotos bovinos fecundados "in vitro".

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ovócitos aspirados de ovários de fêmeas bovinas mestiças, coletados em matadouro, e maturados "in vitro" em meio TCM (tissue culture medium) 199 acrescido de 10% de soro de vaca em cio (SVC) e 20 µg/ml de FSH, durante 24 horas. Na fecundação "in vitro" foram utilizados espermatozóides obtidos por "swin up", com concentração de $1,8 \times 10^6$ espermatozóides/ml, por 22 h. Ao término desse período, os ovócitos foram divididos aleatoriamente nos tratamentos, de acordo com os experimentos. O experimento um consistiu do cultivo em co-cultura com monocamada de células da tuba uterina ou com células da granulosa, ambos em 10% de SVC. O experimento dois consistiu do cultivo com 10% de SVC ou de soro fetal bovino (SFB), em co-cultura com células da granulosa. Ambos os experimentos foram realizados em meio CR1aa (ROSENKRANKS & FIRST, 1994). Foram avaliadas a taxa de clivagem, blastocisto e blastocisto eclodido. As células da tuba uterina e da granulosa foram obtidas de material coletado em matadouro e cultivadas durante dois dias antes de receberem os ovócitos recém-fecundados. A maturação, fecundação, cultivo embrionário "in vitro" e das células da tuba uterina e granulosa foram realizadas em estufa incubadora com 5% de CO₂ em ar atmosférico com 95% de umidade e 38,8°C. A análise estatística foi realizada pelo Teste do Qui quadrado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em ambos os experimentos não foram observadas diferenças quanto à clivagem, produção de blastocisto e eclosão (Quadro 1). Tanto as células da granulosa ou da tuba uterina, bem como o SVC ou SFB, promoveram o desenvolvimento embrionário com resultados semelhantes. Segundo FENG et al. (1994), embora ambos os tipos de células possam secretar fatores embriotróficos, é possível que produzam fatores benéficos diferentes ou quantidades diferentes de um mesmo fator. Entretanto, apesar de poder existirem fatores diferentes, seus efeitos podem ser parecidos entre si, como os observados no presente estudo. O mesmo é válido para o SVC e SFB. Alguns tipos de soro podem aumentar a blastulação de embriões bovinos (SHAMSUDDIN et al., 1994), enquanto outros aumentam número de células (VAN LANGENDONCKT et al., 1997), porém, o resultado final parece ser semelhante. Diversos fatores que estão envolvidos no desenvolvimento embrionário e na eclosão de blastocistos, tais como vitaminas, aminoácidos e fatores do crescimento, podem ser produzidos pelas células utilizadas na co-cultura ou estar presentes no soro utilizado nesse sistema de cultivo (MOSES et al., 1997, GHOSH & SENGUPTA, 1998). Os resultados aqui observados sugerem que as células da tuba uterina e da granulosa ou o SVC e SFB têm efeitos similares na produção do embrião, podendo assim possuir em comum alguns desses fatores necessários para desenvolvimento embrionário "in vitro".

CONCLUSÃO

As células da tuba uterina ou granulosa, assim como o soro de vaca em cio ou soro fetal bovino, em sistemas de cultivo em co-cultura, possuem efeito semelhante sobre o desenvolvimento embrionário, quando avaliados pela taxa de clivagem, produção de blastocistos e a taxa de blastocistos eclodidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction Update* v. 2, p. 91-148, 1995.
2. FENG, H.L., YANG, Q.Z., SUN, Q.Y. et al. Development of early bovine embryos in different culture systems. *Veterinary Record*, v. 135, p. 304-306, 1994.
3. GALLI, C., LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Animal Reproduction Science* v. 42, p. 371-379, 1996.
4. GHOSH, D., SENGUPTA, J. Recent development in endocrinology and paracrinology of blastocyst implantation in the primate. *Human Reproduction Update* v. 4, p. 153-168, 1998.
5. MARQUANT-LE GUIENNE, B., HUMBLLOT, P. Practical measures to improve in vitro blastocyst production in the bovine. *Theriogenology* v. 449, p. 3-11, 1998.
6. MOSES, D.F., MATKOVIC, M., CABRERA FISHER, E., et al. Aminoacid contents on sheep oviductal and uterine fluids.

Theriogenology v. 47, p. 336, 1997.

7.ROSENKRANKS, C.F., FIRST, N.L. Effect of free amino acids and vitamins on cleavage and developmental rate of bovine zygotes in vitro. *Journal Animal Science* v. 72, p. 434-437, 1994.

8.SHAMSUDDIN, M., LARSSON, B., GUSTAFSSON, H., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. A serum-free, cell-free culture systems for development of bovine one-cell embryos up to blastocysts stage with improved viability. *Theriogenology*, v. 41, p. 1033-1043, 1994

9.VAN LANGENDONCKT, A., DONNAY, I, SCHUURBIERS, N. et al. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 109, p. 87-93, 1997.

Clivagem n (%)

QUADRO 1. Efeito do tipo de célula e de soro utilizado em sistema de cultivo em co-cultura.				
	Total	Blastocistos n (%)	Blastocistos eclodidos ¹ n (%)	
Tipo de célula (Exp. 1)				
Tuba uterina	112	73 (65,2%)	13 (11,6%)	3 (23%)
Granulosa	117	78 (66,7%)	16 (13,7%)	8 (50%)
Tipo de soro (Exp. 2)				
Soro fetal bovino	119	76 (63,9%)	17 (14,3%)	7 (41,2%)
Soro de vaca em cio	104	73 (70,2%)	9 (8,65%)	3 (33,3%)

Não houve diferença estatística entre os tratamentos (P>0,05).
1- Taxa de blastocistos eclodidos em função do total de blastocistos produzidos.