

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA OVALBUMINA (OVA) COMO SUPLEMENTO PROTÉICO DURANTE A ETAPA DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

Tetzner, T.A.D.¹; Saraiva, N.Z.¹; Perecin, F.¹; Ferreira, C.R.²; Méo, S.C.³; Oliveira, C.S.¹; Melo, D.S.¹; Monteiro, F.M.¹; Vantini, R.¹; Garcia, J.M.¹

¹DMVPRA-FCAV-UNESP, Jaboticabal-SP, Brasil, ²ZAB-FZEA-USP, Pirassununga-SP, Brasil, ³CPPSE-EMBRAPA, São Carlos-SP, Brasil. tatiane_tetzner@yahoo.com.br

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é considerada como a terceira geração de biotecnologias (THIBIER et al., *Biology of the Cell*, v.75, p.173-180, 1992). Das etapas da PIV, a fecundação é um processo complexo que resulta na união de dois gametas, promovendo a restauração do número de cromossomos para o começo do desenvolvimento de um novo indivíduo (GORDON, Cambridge University Press, p.30-142, 1994). O presente trabalho objetivou avaliar os efeitos da OVA na etapa de fecundação *in vitro* (FIV). Os oócitos foram maturados *in vitro* (MIV) em meio TCM 199 com sais de Earle, suplementado de acordo com os tratamentos: SFB (10% SFB; Crypion®), BSA (Inlab®; 4mg/mL BSA), OVA (Inlab®; 4mg/mL OVA), e 1,0µg/mL de FSH (Pluset®, Calier), 50µg/mL de hCG (Profasi®, Serono), 1,0µg/mL de estradiol (Sigma E-2758), 0,2mM de piruvato de sódio (Biochemical 44094) e 83,4µg/mL de amicacina (Biochimico), durante 24h à temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar. A FIV foi realizada após 24h de MIV, em gotas de 100µL de meio TALP-FIV, com 0,2mM de piruvato, 83,4µg/mL de amicacina e suplementado de acordo com os tratamentos: 6mg/mL de BSA ou 6mg/mL de OVA. Dezoito a vinte horas após o início da FIV (hpi), os possíveis zigotos tiveram as células do *cumulus* removidas, e foram lavados em PBS com 2% de BSA, corados com 10 µg/mL Hoechst 33342 em TCM-199 Hepes, colocados entre lâmina e lamínula, e avaliados quanto à presença e ao número de pronúcleos (PN), em microscópio de epifluorescência. Os tratamentos foram nomeados da seguinte maneira: a primeira letra referente ao tratamento utilizado na etapa de maturação e a segunda na fecundação. Para avaliação das taxas de formação de pronúcleos, foram utilizados 508 prováveis zigotos, distribuídos nos seis grupos experimentais, em quatro repetições. No total dos prováveis zigotos avaliados, 285 (56,10%) apresentaram 2 PN, 159 (31,30%) não apresentaram PN, 26 (5,12%) apresentaram 1 PN e 38 (7,48%) apresentaram mais de 2 PN. Observamos que o grupo SO (76,67% de 2 PN) foi semelhante ($p > 0,05$) ao grupo SB (grupo controle; 82,95% de 2 PN). Por outro lado, as taxas de formação de dois pronúcleos dos demais grupos, BB (56,98%), BO (39,02%), OB (37,36%) e OO (39,24%), foram inferiores ($p < 0,05$) ao grupo controle. As taxas de formação de um pronúcleo (1,23 a 10,84%), de 18 a 20 hpi, foram semelhantes às descritas por Méo Niciura (Tese Doutorado FCAV UNESP, 115f., 2005), em que mesmo nos momentos em que houve predominância de 2 PN, foram encontrados zigotos com 1 PN (16,7 a 28,6%). Para os oócitos submetidos às etapas de maturação e fecundação em meio suplementado com BSA, a formação de pronúcleos foi mais eficiente do que quando a MIV foi realizada com BSA e a fecundação com OVA. Por outro lado, quando a MIV foi realizada com suplementação de OVA e a fecundação com BSA ou OVA, os resultados foram numericamente similares e inferiores, respectivamente, ao grupo BO. Podemos inferir que a formação de pronúcleos é diretamente dependente da etapa de maturação *in vitro*. Apoio financeiro: FAPESP 04/12248-8 e CNPq.

EVALUATION OF OVALBUMIN (OVA) AS A PROTEIN SUPPLEMENT DURING THE PROCEDURE OF *IN VITRO* FERTILIZATION OF BOVINE OOCYTES

In vitro production (IVP) of embryos is considered the third generation of reproductive biotechnologies (THIBIER et al., *Biology of the Cell*, v.75, p.173-180, 1992). Among its procedures, the fertilization step is a complex process that results in the union of two gametes, restoring the chromosome number for the development of a new individual (GORDON, Cambridge University Press, p.30-142, 1994). The present work aimed to evaluate the effects of OVA during *in vitro* fertilization (IVF). The oocytes were *in vitro* matured (IVM) in TCM 199 with Earle's salt, supplemented according to the treatments: FBS (10% FBS; Crypion®), BSA (Inlab®; 4mg/mL BSA), OVA (Inlab®; 4mg/mL OVA), and 1.0µg/mL of FSH (Pluset®, Calier), 50µg/mL of hCG (Profasi®, Serono), 1.0µg/mL of estradiol (Sigma E-2758), 0.2mM of sodium pyruvate (Biochemical 44094), and 83.4µg/mL of amicacin (Biochimico), for 24h at 38.5°C and atmosphere of 5% CO₂ in air. The IVF was performed after 24h of IVM, in 100µL droplets of TALP-IVF, with 0.2mM pyruvate, 83.4µg/mL amicacin and supplemented, according to the treatments, with 6mg/mL BSA or 6mg/mL OVA. Eighteen to twenty hours after the beginning of IVF (hpi), the possible zygotes were denuded, and they were washed in PBS with 2% BSA, stained with 10µg/mL Hoechst 33342 in TCM-199 Hepes, mounted on slides, and assessed for the presence and number of pronucleus, in epifluorescence microscope. Each treatment was named using the first letter to design the treatment used during IVM and the second letter during IVF. To evaluate pronucleus development rates, 508 probable zygotes were distributed in six experimental groups in four replicates. From the total of presumable zygotes, 285 (56.10%) presented two pronuclei, 159 (31.30%) didn't present any pronucleus, 26 (5.12%) presented 1 PN, and 38 (7.48%) presented more than 2 pronuclei. We observed that the FO group (76.67% of 2 PN) was similar ($p > 0,05$) to the FB group (control group; 82.95% of 2 PN). On the other hand, the two-pronucleus development rates in treatments BB (56.98%), BO (39.02%), OB (37.36%), and OO (39.24%) were inferior ($p < 0.05$) to the control group. Pronucleus development rates ranged from 1.23 to 10.84% at 18 to 20 hpi and they were similar to that described by Méo Niciura (Tese Doutorado FCAV UNESP, 115f., 2005), where even in moments with predominance of 2 PN zygotes, there were zygotes with 1 PN (16.7 to 28.6%). Pronucleus development was more efficient in oocytes matured and fertilized in medium supplemented with BSA, than when IVM medium was supplemented with BSA and IVF with OVA. On the other hand, when IVM medium was supplemented with OVA and IVF with BSA or OVA, the results were respectively similar and inferior to BO. We can infer that pronucleus formation after fertilization is directly dependent on the step of *in vitro* maturation.