

OK

PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO* EM MEIOS QUIMICAMENTE DEFINIDOS

Simplicio, A.A.¹; Brackett, B.G.²; Keskinetepe, L.³

Department of Physiology and Pharmacology, College of Veterinary Medicine,
The University of Georgia, Athens GA 30602-7389, USA^{1,2,3}.

EMBRAPA - CNPC, C. P. D- 10, 62.011 - 970, Sobral, Ceará, Brasil¹.

Augusta Reproductive Biology Associates, 812 Chafee Avenue,
Augusta Georgia 30904, USA³.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da adição de glicose e de soro fetal bovino (SFB), ao meio de cultivo sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro* a partir das ~~72~~⁷² horas após a inseminação. Folículos medindo de dois a cinco milímetros de diâmetro foram aspirados dentro de 30 minutos após o abate. A seleção dos ovócitos e todas as demais etapas do processo foram conduzidas em câmara aquecida a 39°C. Apenas, os ovócitos com, no mínimo, duas camadas de células do cummulus e citoplasma homogêneo foram usados. Os ovócitos foram lavados, duas vezes, em solução Tyrode's adicionada de 0,3 mg de álcool polivinílico (PVA) e 112 µg de piruvato de sódio e, uma vez, em TCM 199 hepes modificado e incubados em 100 µl de m-TCM 199 adicionado de 10 µg de FSHo/ml e 5 µg de LHb/ml (NHPP, NIDDK, NICHD, USDA) por 24 horas. O swim-up, a lavagem do sêmen e a inseminação foram feitas em meio definido, constando de solução salina isotônica acidificada, glicose, bicarbonato de sódio, piruvato de sódio anidro, álcool polivinílico, benzoato de cafeína sódica e penicilamina. Após 24 horas de incubação, os ovócitos, em número de 20 a 25, foram inseminados com $2,0 \times 10^6$ espermatozoides por ml, capacitados em heparina, em gotas com um volume total de 100µl. Os ovócitos, os espermatozoides e os embriões foram incubados sob óleo de parafina, em câmara umidificada e numa mistura gasosa composta de CO₂ - 5%, O₂ - 5% e N₂ - 90%. Entre 18 e 24 horas após a inseminação, os presumíveis zigotos (PZ) foram desnudados mecanicamente e lavados, uma vez, no meio de cultura Synthetic Oviduct Fluid (SOF), enriquecido com aminoácidos não-essenciais (ANE) sendo, em seguida transferidos em número médio de 25, para gotas de 50µl deste meio (T₁) ou para SOF sem ANE e sem glicose (T₂) pelas primeiras 48 horas. Após ~~72~~⁷² horas da inseminação, o percentual de clivagem foi determinado e os embriões novamente lavados e transferidos para novas gotas do meio correspondente para T₁. No T₂ o meio de cultivo foi adicionado de glicose e SFB a 10%. Todo e qualquer embrião que se encontrava com apenas quatro células, foi removido do experimento. A partir das 72 horas, não ocorreu nenhuma mudança de meio de cultivo, parcial ou total. O desenvolvimento embrionário para os estágios de mórula (Mo), blastocisto (Bl) e blastocisto expandido (Bx) foi avaliado às 120, 168 e 192 horas, respectivamente, após a inseminação e todas as porcentagens foram calculadas com base no número de ovócitos inseminados, 255 para T₁ e 235 para T₂. Os dados foram analisados por Qui-quadrado dentro dos respectivos estágios de desenvolvimento. As porcentagens de clivagem, Mo, Bl e Bx foram 67,45; 42,35; 22,35 e 13,72, para T₁ e 69,78; 41,27; 14,46 e 3,2 para T₂. Não houve diferença estatística (P>0,05) para clivagem e Mo. Entretanto, as proporções de Bl e Bx foram estatisticamente diferentes (P<0,05) entre T₁ e T₂. Conclui-se que a ausência da glicose durante às primeiras 48 horas de cultivo e a presença de SFB não influenciam o desenvolvimento embrionário. Conclui-se, ainda, que é satisfatório o desenvolvimento embrionário *in vitro*, em condições de meios quimicamente definidos. Os autores agradecem a EMBRAPA; a Genex Cooperative, Ithaca, NY; a Shapiro Packing Co, Augusta, GA e, a NHPP, NIDDK, NICHD, USDA.