

RESUMO 139

AValiação da Quantidade, Qualidade e da Maturação *in vitro* de Oócitos de Ovelhas Santa Inês Obtidos em Sucessivas Sessões de Aspiração Folicular

Padilha, L.C.; Teixeira, P.P.M.; Pires-Buttler, E.A.; Apparicio, M.; Lima, M.R.; Motheo, T.F.; Vicente, W.R.R.

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual, Paulista, Campus Jaboticabal, SP - Brasil
E-mail: padilhac@yahoo.com.br

Os pequenos ruminantes apresentam-se como um bom modelo para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas de animais domésticos. A produção de embriões *in vitro* (PIV) pode potencializar os programas de melhoramento genético. No entanto, vários fatores relacionados à técnica ainda necessitam serem estudados. O sucesso da realização da PIV requer a utilização de uma técnica de coleta efetiva e eficiente para obtenção de oócitos, e os melhores resultados em ovinos têm sido obtidos aplicando a técnica de recuperação de oócitos por aspiração laparoscópica. Deste modo, com o objetivo de avaliar se sucessivas sessões de aspirações foliculares por interferem na quantidade, qualidade e na maturação *in vitro* de oócitos obtidos de ovelhas submetidas à estimulação hormonal, foram realizadas cinco sessões semanais de aspiração folicular de seis ovelhas da raça Santa Inês. Os animais tiveram o estro sincronizado por protocolo curto (implante de 60mg de acetato de medroxiprogesterona por 6 dias, no D5 foram aplicados 37,5µg de D-cloprostenol e 300UI de eCG via IM) e posterior à sincronização foram estimuladas com 80mg de FSHp e 300 UI de eCG, em aplicação única feita 36 horas anterior às punções foliculares. O procedimento foi realizado por videolaparoscopia com um intervalo de sete dias entre as sessões. Os oócitos obtidos foram avaliados com relação à homogeneidade do citoplasma e número de camadas das células do cumulus, conforme os critérios morfológicos adotados por Hewitt e England (1997; Journal of Reproduction and Fertility, 51:83-91). O meio de maturação usado foi de TCM-199, suplementado com FSH, hCG, estradiol, cisteamina, piruvato de sodio, antibiótico e soro fetal bovino, no qual os oócitos permaneceram durante 24 horas, em estufa a 39 °C, com 5% de CO₂ em ar e atmosfera úmida. Em cada sessão foram avaliados o número de oócitos recuperados, a qualidade dos oócitos e a taxa de maturação nuclear e citoplasmática. Os dados foram expressos em média e desvio padrão, realizando o teste one-way ANOVA e teste de Tukey. O número de oócitos recuperados foi de 5±2,517 não havendo variação entre as semanas (p>0,05), tendo 2±1,180 de grau I, 2±1,130 de grau II, 1±0,8307 de grau III e 0±0,3742 de degenerados, havendo diferença entre os graus (p<0,001). Na maturação não houve diferença entre as semanas (p>0,5) sendo 50% processados para a maturação, sendo total maturado por animal 3±1,291, tendo 1±1,129 maduros, 0±0,9335 imaturos e 1±1,250 degenerados ou não identificados na maturação nuclear (p>0,05) e 1±1,057 maduro, 0±0,9016 imaturo e 1±1,286 degenerados ou não identificados na maturação citoplasmática. Conclui-se que a realização de até cinco sessões de aspiração folicular em ovelhas Santa Inês não acarretou alterações na quantidade, qualidade e maturação oocitária.

RESUMO 140

APOPTOSE EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *in vitro* UTILIZANDO OÓCITOS MATURADOS EM MEIO LIVRE DE SORO E BAIXA TENSÃO DE OXIGÊNIO
Pereira, M.M.¹; Serapião, R.V.²; Quintão, C.R.C.³; Iguma, L.T.³; Viana, J.H.M.³; Camargo, L.S.A.¹

¹Universidade Federal de Juiz de Fora, MG; ²Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG; ³Pesagro, Rio de Janeiro, RJ - Brasil
E-mail: mimunckif@yahoo.com.br

A maturação *in vitro* (MIV) é uma fase crítica da produção *in vitro* de embriões (PIV) e vários fatores podem influenciar sua eficiência, tais como a suplementação protéica e a tensão atmosférica. O presente estudo objetivou analisar o efeito do soro e baixa tensão de oxigênio (O₂) durante a MIV na incidência de apoptose nos blastocistos produzidos. Oócitos imaturos foram aleatoriamente distribuídos nos seguintes grupos: G1 (10% soro de vaca no cio [SVC] em 20% O₂); G2 (0,1% álcool polivinílico [PVA] em 20% O₂); G3 (10% SVC em 5% O₂) e G4 (0,1% PVA em 5% O₂). O meio de maturação foi TCM199 (Invitrogen, Califórnia, EUA) e tensão de CO₂ foi de 5% para todos os tratamentos. Após a MIV os oócitos foram fertilizados *in vitro* em gotas de 100 µl de meio Fert-TALP suplementado com heparina com a dose inseminante de 2x10⁶ espermatozoides/mL por 21 h em atmosfera com umidade de 95% e 5% CO₂ e 38,8 °C em ar. Os possíveis zigotos foram desnudados por vórtex em 0,1% de solução de hialuronidase e cultivados em meio CR2aa (Wilkinson *et al.* 1996; Theriogenology, 45: 41-49) suplementado com 2,5% de soro fetal bovino (Nutricell, Campinas, SP, Brasil) em 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ a 38,5°C. No oitavo dia após fertilização os blastocistos do G1 (n=22), G2 (n=18), G3 (n=19) e G4 (n=18) foram fixados e submetidos a técnica de TUNEL (DeadEnd™ Florimetric TUNEL System PROMEGA), de acordo com as instruções do fabricante. O número total de células, o número de células apoptóticas e o índice apoptótico (calculado pela divisão do número de células apoptóticas pelo número total de células) foram analisados pela análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Student Newman Keuls. O nível de significância adotado foi P= 0,05. Em baixa tensão de O₂ (5%) o número total de células não foi afetado (P>0,05) quando o SVC (G3: 112,73±2,87) foi substituído pelo PVA (G4: 111,11±2,67). No entanto, em alta tensão de O₂ (20%) foi observado maior (P<0,05) número total de células no grupo maturado com SVC (G1: 116,90±2,60) quando comparado com PVA (G2: 85,7±2,49). Blastocistos do G4 apresentaram menor (P<0,05) número de células apoptóticas (10,72±1,25) comparado com G1 (20,95±1,29), G2 (19,50±1,42) e G3 (21,73±1,29), além de menor (P<0,05) índice apoptótico (0,09±0,01) que os blastocistos dos outros grupos (G1: 0,18±0,01; G2: 0,22±0,01 e G3: 0,19±0,01). Em conclusão, o sistema de maturação com PVA e 5% O₂ fornece um ambiente de maturação *in vitro* que resulta em blastocistos com baixo índice apoptótico. Apoio financeiro: Fapemig.

RESUMO 141

AValiação de Alterações Morfológicas Durante o Desenvolvimento de Embriões Bovinos Fecundados *in vitro* com Sêmen Exposto Experimentalmente à *Escherichia coli* Produtora da Toxina Shiga Stx2 (STEC)

Piccolomini, M.M.; Goes, A.C.; Pávão, D.L.; Batista, M.L.; Alves, M.F.; Nassar, A.; Myashiro, S.; Catroxo, M.; D'Angelo, M.

Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo - Brasil
E-mail: mari.mmp@uol.com.br

Embora cada vez mais utilizadas, as técnicas de reprodução assistida ainda necessitam de pesquisas que avaliem os riscos sanitários de oócitos, embriões e espermatozoides, uma vez que as mortalidades embrionária e fetal têm um grande impacto na rentabilidade de qualquer sistema de reprodução animal. O objetivo desse trabalho foi avaliar por meio de microscopia óptica e eletrônica de transmissão, as alterações na morfologia durante o desenvolvimento de embriões bovinos fecundados com sêmen exposto experimentalmente à *Escherichia coli*, produtora da toxina Shiga stx2. Para tanto, oócitos foram aspirados de ovários de vacas abatidas e os que apresentaram zona pelúcida íntegra foram selecionados e maturados. Após 20 horas, os oócitos foram divididos em grupo controle (n=418), fecundado com sêmen controle e contaminado (n=415), fecundado com sêmen exposto à 200UFC de *E. coli* produtora da toxina Shiga stx2. Cada amostra de sêmen foi tratada pela técnica de gradiente descontinuo de Percoll, sendo que a concentração espermática foi ajustada em aproximadamente 100.000 espermatozoides para cada oócito. Após o período de fecundação, os embriões foram avaliados quanto a sua morfologia, através da microscopia óptica e eletrônica de transmissão. Os oócitos fecundados com o sêmen contaminado (52,8%; n=219/415) apresentaram retração citoplasmática, falhas na divisão, assimetria de blastômeros, oplasma granuloso, com coloração castanho escura, formação de vacúolos, degeneração e rompimento da zona pelúcida. Através do corte semi-fino foram observadas células granulosa e vacuolizadas, apresentando estruturas semelhantes à *E. coli*, que foram confirmadas através da microscopia eletrônica de transmissão. Essas alterações não foram observadas no grupo controle (70,3%; n=294/418). A presença da *E. coli* produtora da toxina shiga stx2 causa alterações morfológicas durante o desenvolvimento embrionário. A boa higienização do prepúcio do touro e dos materiais utilizados durante a coleta, com descontaminantes adequados, são de extrema importância, assim como o uso de antibióticos eficientes durante a diluição do sêmen, para que este se apresente livre de qualquer contaminação, já que o procedimento utilizado durante a FIV (Percoll) não se mostrou eficaz.