



A interferência do tempo de fecundação *in vitro* nas taxas de blastocisto e clivagem

Cleicione Moura de Oliveira Trevisan¹, Luiza Vieceli Nunes², Ana Caroline Silva Soares³

¹ Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná - UniSL, Ji-Paraná, RO, Brasil. E-mail: cleicioneoliveira80@gmail.com.

² Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário São Lucas Ji-Paraná - UniSL, Ji-Paraná, RO, Brasil. E-mail: luizaviecelin@gmail.com

³ Médica Veterinária Doutora em Farmacologia e Biotecnologia. Embriologista do laboratório de produção *in vitro* de embriões bovinos Múltipla Embriões. E-mail: carol.silvasoares@yahoo.com.br

1. Introdução

A pecuária no Brasil vem crescendo constantemente através do emprego de biotecnologias que são capazes de maximizar os resultados e índices reprodutivos, entre as biotecnologias podemos citar a PIVE que se destaca por colaborar com a diminuição do intervalo entre as gerações e com a seleção de novos reprodutores (LUEDKE, 2018). A PIVE (produção *in vitro* de embriões) é uma técnica que reúne vários outros procedimentos, como a OPU (*ovum pick up* - aspiração folicular), MIV (maturação oocitária *in vitro*), FIV (fecundação *in vitro*), e CIV (cultivo embrionário *in vitro*). Essa técnica tem sido usada comercialmente por algumas empresas com resultados razoáveis, tendo como principal objetivo comercial a obtenção de embriões viáveis de fêmeas que não estão mais aptas a produzirem descendentes de outras formas. Pode ser utilizado em fêmeas a partir do 6 mês de idade, em gestantes até o terceiro mês e no período de 2 a 3 semanas pós parto (BUENO e BELTRAN, 2008).

A OPU é realizada através de aspiração folicular guiada por ultrassom, sendo responsável pela obtenção do material genético das fêmeas (SILVA *et al*, 2021), essa técnica possui a vantagem de poder ser realizada em qualquer fase do ciclo estral sem interferir no estado fisiológico do animal, uma vez que não necessita de intervenção hormonal (LUEDKE2018). Nesse processo, um sistema de bomba a vácuo acoplado à uma agulha hipodérmica descartável, faz a recuperação dos oócitos e do líquido folicular direcionando em um tubo coletor, este material coletado será lavado e transferido para tubos para serem transportados até o laboratório para maturação (GOODHAND *et al*, 1999). A MIV é o processo pelo qual os oócitos passam por várias alterações nucleares e citoplasmáticas, que permitem a eles expressarem seu potencial máximo de desenvolvimento após a fecundação, sendo considerado uma das etapas mais importantes da PIVE (GOTTARDI e MINGOTI, 2009). A FIV ocorre no dia 0 (D0) e é a fusão do oócito com o espermatozoide (após sua capacitação) dando origem ao zigoto (SIRARD, 2017). Após o tempo de fecundação, as estruturas são lavadas e transferidas para placas com microgotas de meio de cultivo específico, recobertas com óleo mineral (LOIOLA *et al*, 2014). Durante a CIV o zigoto passa por diversas divisões celulares até se constituir em blastocistos, estágio adequado para a transferência ao útero (MELO *et al*, 2016).

O meio de cultivo é renovado no terceiro e no quinto dia, e os prováveis zigotos permanecem nessas gotas por seis dias (LOIOLA *et al*, 2014). É nesse período de desenvolvimento pré-implantação que irá ocorrer a ativação do genoma embrionário, as divisões celulares, compactação dos blastômeros e o início da diferenciação embrionária com a formação do blastocele (HOSHI, 2003).

As condições do cultivo *in vitro* são de extrema importância para que sejam alcançados bons índices de produção, por isso há inúmeras pesquisas sendo realizadas visando avaliar os diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos que podem afetar o metabolismo e a capacidade de

desenvolvimento destes embriões (NAGAI, 2001). Este trabalho tem como objetivo comparar o tempo da fertilização *in vitro* e o seu impacto na taxa de clivagem e na produção total de blastocistos.

2. Material e Método

Foram utilizados 787 oócitos aspirados de fêmeas nelores coletados em propriedades distintas por punção guiada por ultrassom (OPU), estes oócitos são recolhidos em tubos de 50 mL juntamente com o líquido folicular e em seguida levados para lavagem e seleção.

Os oócitos são filtrados e lavados com solução fisiológica (0,9% NaCl) acrescidas de soro fetal, heparina e antibiótico (amicacina) a 36°C. Depois as estruturas são colocadas em uma placa de petri de 60 mm ainda com um pouco dessa solução, onde passaram por uma seleção e classificação com auxílio de estereomicroscópio. Na sequência foram lavados em meio comercial OOCYTE-IVM HEPES (Botupharma, Botucatu – SP) e colocados em criotubos com 400 microlitros de meio de OOCYTE-IVM (Botupharma, Botucatu – SP) e 100 µL de óleo mineral (Botupharma, Botucatu – SP) e transportado até o laboratório por um transportador portátil que possui circulação de mistura de gás, 5% CO₂; 5% O₂ e 90% N₂, (Labmix; WTA, Cravinhos – SP). As estruturas permanecem na transportadora até o final da maturação aproximadamente 24h.

Após a maturação, os oócitos são direcionados para a fecundação *in vitro*. Os oócitos maturados passaram por uma lavagem em meio CULTURE-IVF (Botupharma, Botucatu – SP) e então foram colocados em microgotas de 80 µL deste mesmo meio em placas de petri recobertas por óleo mineral. O sêmen foi descongelado com água filtrada a 36,5°C por 30 segundos, colocados em microtubos com gradiente de concentração utilizando o SPERM-SELECT (Botupharma, Botucatu – SP) de acordo com as instruções do fabricante. Uma vez no gradiente, o sêmen foi colocado para centrifugar a 5500 rpm (rotações por minuto) para a separação do material viável. Em seguida, foi centrifugado novamente a 1200 rpm com meio CULTURE-IVF afim de remover os detritos de crioprotetor e o pellet formado foi retirado e reservado para serem colocados em microgotas onde os estavam acondicionados os oócitos. A fecundação foi realizada em incubadora com atmosfera controlada com 5% de CO₂ e alta tensão de O₂ a uma temperatura de 38,6°C, e se deu em condições iguais, pelos períodos distintos de 10 ou 18 horas. Todas as rodadas avaliadas utilizaram partidas de sêmen congelado do touro COMBOIO FIV DA S. NICE provenientes da central de touros ABS Pecplan, Uberaba -MG.

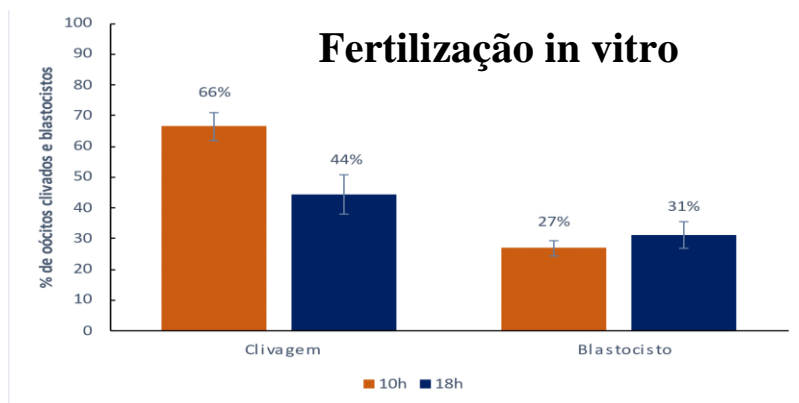
O presente estudo não necessitou da autorização do CEUA, pois os dados foram obtidos de tabelas de produção do laboratório comercial Múltipla Embriões.

3. Resultado e discussão

Quando comparado o processo de desenvolvimento embrionário realizando a fecundação *in vitro* no período de 10 ou 18 horas do touro Comboio, foi possível visualizar que o tempo de fecundação em 10 horas foi positivo em relação as taxas de clivagem, alcançando uma média de 66% ($\pm 4,54$). Enquanto que, a fecundação realizada com 18 horas culminou em uma média de 44% ($\pm 6,29$). Já quando se fala em produção total de blastocistos, com 10 horas de fecundação a média de produção foi de 27% ($\pm 2,54$), e com 18 horas a taxa de blastocistos finais atingiu 31% ($\pm 4,45$). Esses resultados podem ser conferidos no gráfico abaixo (Fig. 1).

Mesmo que essas amostras não possam ser comparadas estatisticamente pelo fato de terem sido realizadas em momentos distintos, é possível visualizar um aumento considerável nas taxas de clivagem. No entanto, este fato não interferiu na média de blastocistos totais, demonstrando valores semelhantes.

Figura 1. Efeitos do tempo de fecundação *in vitro* sobre a porcentagem de clivagem e blastocisto total após dez horas (Grupo 10h; n=372 óocitos) e após dezoito horas (Grupo 18h; n=415 óocitos).



Em um trabalho realizado por Ramos *et al* (2000), identificou-se que a taxa de clivagem somente foi afetada pelo efeito do touro em uma comparação entre a fecundação de dois touros com tempos diferentes de 12 e 18 horas, esse resultado não confere com o encontrado neste trabalho. Em outro estudo, Dias *et al* (2006) demonstra que a fecundação realizada em 18 horas pode interferir no resultado da clivagem, sendo que a clivagem com 12 horas apresentou um resultado de 47,86% enquanto que com 18 horas de fecundação o resultado foi de 52,96%, no estudo apresentado aqui, a taxa de clivagem foi maior nas fecundações com dez horas de duração. Xu e Greve (1988) citando Ramos *et al* (2000) relata que o aumento do tempo de exposição ao espermatozoide promove o aumento da taxa de penetração, porém esse resultado é contrário aos resultados encontrados no presente trabalho.

O tempo de fecundação mais longo associado a touros de penetração mais rápida foi relacionada a maiores índices de polispermia em um estudo realizado por STTAR *et al* (2011). Em touros com capacidade de penetração mais rápida, foi identificado que o tempo ideal seria de 8 horas, e para os touros mais lentos um período de 16 horas é necessário para aumentar a taxa de clivagem (STTAR *et al*, 2011). Esses dados corroboram com o nosso estudo, que demonstra que a fecundação realizada em um tempo menor é eficiente em atingir altas taxas de clivagem, fato que se mostra vantajoso pois o tempo diminuído de FIV pode atenuar casos de polispermia, já que este acontecimento compromete o desenvolvimento embrionário.

Em um estudo realizado por DODE *et al* (2001) onde foi comparado diferentes tempos de co-incubação, foi observado uma menor taxa de clivagem quando realizada fecundação por 3 horas (13,1%), enquanto as porcentagens de clivagem foram aumentando progressivamente nos tempos de 6 (54,4%) e 12 horas (67,6%), não foram observadas diferenças entre 12 e 18 horas. A partir disso, os melhores resultados foram considerados na fecundação por um período de 12 horas, porém não foram observados efeitos prejudiciais no prolongamento desse tempo até as 18 horas.

Sabe-se que em co-cultivo longo os embriões podem ser prejudicados pela presença de espécies reativa de oxigênio (EROs) produzidas pelos espermatozoides (GINAROLI *et al*, 1996). Foi demonstrado em estudo realizado por WARD *et al* (2002) que o período de co-incubação de 9 a 10 horas é suficiente para garantir máxima clivagem e rendimento de blastocistos. A produção de EROs causa um estresse oxidativo no cultivo *in vitro*, e entre seus efeitos deletérios há a peroxidação lipídica que tem sido relacionada com o bloqueio do desenvolvimento e redução da viabilidade embrionária (CROCOMO *et al*, 2012). Ainda segundo COSTA *et al* (2022), o estresse oxidativo diminui a proteção antioxidante da célula, e esse distúrbio está associado a altas taxas de morte celular durante a CIV. Diante isto, podemos apontar que a realização da FIV por um período diminuído, como 10 horas, pode trazer

benefícios ao desenvolvimento embrionário, uma vez que após o período indicado, os prováveis zigotos serão transferidos a uma nova placa, perdendo o contato com os detritos de espermatozoides responsáveis pela produção de EROs.

4. Conclusão

No estudo realizado, avaliando as planilhas de produção de embriões *in vitro* do laboratório Múltipla Embriões, é possível concluir que as rotinas de PIVE realizadas com tempos de fecundação diferentes podem afetar taxa de clivagem. Apresentando um resultado mais positivo em relação a taxa de clivagem quando a FIV transcorreu por um período de 10 horas. No entanto, notou-se pouca diferença na taxa de blastocistos entre os grupos. Ainda que este estudo não possa ser comparado diretamente de forma estatística, por ter ocorrido em momentos distintos, os indícios no aumento da taxa de clivagem mesmo sem afetar a taxa final de blastocisto, pode ser apresentado como um indicativo positivo durante a rotina de produção *in vitro* de embriões bovinos.

5. Referências

BUENO, Ataliba Perina; BELTRAN, Maria Paula. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 11, p. 1-7, 2008.

CROCOMO, Leticia Ferrari et al. Produção de embriões *in vitro*: estresse oxidativo e antioxidantes. **Veterinária e zootecnia**, p. 470-479, 2012.

DAS CHAGAS COSTA, Francisco et al. Influência das espécies reativas de oxigênio durante o cultivo *in vitro* de oócitos e folículos ovarianos de mamíferos domésticos. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 46, n. 1, p. 28-42, 2022.

DIAS, L. P. B. et al. Concentração espermática e tempo de incubação na fecundação *in vitro* usando-se sêmen de touros da raça Guzerá. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 348-353, 2006.

DODE, M. A. N. et al. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 69, n. 1-2, p. 15-23, 2002.

GOODHAND, K. L.; WATT, R. G.; STAINES, M. E.; HUTCHINSON, J. S. M. *In vitro* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine Don or spired at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, n. 5, p. 951-961, 1999.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 33, n. 2, p. 82-94, 2009.

LOIOLA, Marcus Vinícius Galvão et al. Validação de um programa de produção *in vitro* de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, p. 93-101, 2014.

LUEDKE, Felipe Eduardo. Aspectos técnicos da produção *in vitro* de embriões bovinos-revisão. 2018.

RAMOS, Alessandra de Almeida et al. Fecundação in vitro com sêmen de bovinos da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 360-365, 2000.

SIRARD, M. A. 2017. The influence of in vitro fertilization and embryo culture on the embryo epigenetic constituents and the possible consequences in the bovine model. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 8, 411-417.

WARD, Fabian et al. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 2105-2117, 2002.