

INFLUÊNCIA DE DIFERENTES GRADIENTES DE DENSIDADE UTILIZADOS NA SELEÇÃO ESPERMÁTICA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

CARDOSO, T.F.^{1,2}; GONÇALVES, A.O.^{1,2}; PRADIEÉ, J.^{1,2}; MADEIRA, E.M.^{1,2}; PEGORARO, L.M.C¹

¹ Laboratório de Reprodução Animal. Embrapa Clima Temperado.

² Laboratório de Reprodução Animal – ReproPel - Faculdade de Veterinária – UFPel.

Email: tainaacardoso@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotécnica amplamente utilizada na reprodução de bovinos, proporcionando um aumento do padrão genético e da produção animal. Além do mais, é vastamente utilizada em pesquisas que visam esclarecer questões ligadas ao desenvolvimento embrionário e a otimização do processo. Tais estudos vêm promovendo uma melhora na qualidade da produção embrionária (Camargo et al., 2003).

Neste âmbito adaptações no que diz respeito à seleção espermática estão em desenvolvimento, visto que esta etapa é capaz de determinar o sucesso da produção de embriões, pois tem como objetivo separar os espermatozoides viáveis, bem como eliminar resíduos de crioprotetores e diluentes (Henkel & Schill, 2003)

Atualmente o gradiente de Percoll® é o método mais utilizado na maioria dos laboratórios de PIV em bovinos (Cesari et al., 2006). Contudo, há indícios que este método seja capaz de ocasionar efeitos de toxicidade, levando a danos ao espermatozoide e ao embrião (De Vos et al., 1997). Dentre as alternativas que vem sendo pesquisadas para a substituição do Percoll, estão outros minigradientes de densidade, como o Miniisolate - composto por sílica coloidal; e o Minioprep - constituído de iodixanol, além do Minipercoll (Mousset-Siméon et al., 2004; Resende et al., 2009).

Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito de diferentes metodologias de preparação espermática utilizando gradientes de densidade Percoll, Minipercoll, Miniisolate e Minioprep na PIV de embriões bovinos, comparando taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário em D8.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

A produção de embriões foi realizada a partir de ovários bovinos provenientes de abatedouros do município de Pelotas/RS. Os ovários foram coletados logo após o abate dos animais e transportados ao Laboratório de Reprodução Animal – Embrapa Clima Temperada, em solução de 0,9% de NaCl suplementado com gentamicina, a 30°C. Os complexos cumulus-oócitos (CCO's) foram aspirados a partir de folículos com 2 a 8 mm de diâmetro com auxílio de uma bomba com pressão de vácuo contínuo. Após lavagem e seleção, os CCO's que apresentavam várias camadas de células do cumulus e um citoplasma homogêneo, foram incubados por 22 a 24 horas para maturação *in vitro*. Os CCO's maturados foram inseminados com uma mesma

partida de sêmen bovino da raça Angus e descongelado à 35°C por 30 segundos e submetido aos diferentes gradientes: Percoll, Minipercoll, Minisolate e Minioprep.

Os gradientes foram preparados da seguinte forma - Percoll: em um tubo Falcon de 15 mL foi colocado 2 mL do gradiente a 90% e acima 2 mL do gradiente a 45%. Minipercoll: em um eppendorf foi colocado 400 µL do a 90% e 400 µL do a 45%. No grupo Miniisolate, em um microtubo de 1,5 mL foram colocados 400 µL do Isolate® a 90% e 400 µL a 45%. E no Minioprep, em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados 400 µL do Oprepre®, nas concentrações de 30, 28 e 26%.

Posteriormente eram adicionados 300 µL da amostra de sêmen na superfície de cada gradiente e levados a centrifugação: grupo Percoll a 700g por 20 min; grupo Minipercoll a 700xg por 5 min; grupo Miniisolate a 700xg por 5 min; e o grupo Minioprep a 900xg por 15min.

Ao final da primeira centrifugação, em todos os tratamentos, eram descartados os sobrenadantes. Os pellets, contendo os espermatozoides, foram então resuspenso em 2 mL (percoll) e 400 µL (minipercoll, miniisolate e minioprep) de Sp-TALP e todos levados a uma segunda centrifugação a 700 x g por 5 min. Depois da segunda centrifugação, os novos pellets eram novamente resuspenso em 40 µL de meio de fecundação. A dose inseminante foi de 1×10^6 espermatozoides/mL, auxílio da câmara de Neubauer, sendo efetuada a correção a partir da motilidade após cada metodologia de preparação espermática.

Após 20 horas, os prováveis zigotos foram transferidos para o cultivo *in vitro* - meio SOFaa durante oito dias. Em D2 foi avaliada a taxa de clivagem e em D8 a de desenvolvimento embrionário, considerando viáveis os embriões que estivessem em estágio de desenvolvimento de blastocistos.

As etapas de maturação, fecundação foram realizados em estufa a 39° C, com 5%CO₂ e umidade saturada. O cultivo embrionário foi efetuada em estufa a 39° C e em *bag systems* com 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂.

As taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário foram comparadas através do teste do Qui-quadrado com 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A comparação das taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário de cada tratamento pode ser observada na Tab 1. Não foi observada diferença estatística entre os gradientes ($p > 0,05$), demonstrando que os minigradientes promovem taxas de desenvolvimento embrionário similares.

Desta forma, todos os minigradientes podem ser considerados como alternativas promissoras ao gradiente de Percoll, trazendo vantagens à rotina de produção de embriões bovinos *in vitro*, pois diminui o tempo de processo para a seleção espermática, além de diminuir custos - uma vez que utiliza menores volumes dos gradientes. Dando ênfase principalmente ao Miniisolate e Minioprep, pois até o momento não foi relatado danos ao desenvolvimento embrionário. Relatos referentes ao uso do Percoll que apresentam em sua composição a polivinilpirrolidona – composto relacionado à toxicidade deste gradiente (kato & Nagao, 2009).

Tabela1: Comparação das taxas de clivagem em D2 e de desenvolvimento embrionário em D8 nos diferentes tratamentos

Tratamento	Nº ovócitos	Clivados (%)	Desenvolvimento D8 (%)
Percoll	408	245 (60)	88 (36)
Minioptiprep	415	292 (70)	120 (41)
Minipercoll	382	258 (67)	102 (39)
Miniisolate	379	254 (67)	92 (36)

P>0,05

4 CONCLUSÃO

Concluimos que a utilização dos diferentes minigradientes promoveu desenvolvimento embrionário similar quando comparado ao gradiente de densidade de Percoll convencional. Desta forma sua utilização em rotinas de produção *in vitro* de embriões bovinos é uma alternativa à utilização do gradiente de Percoll, capaz de diminuir o custo e tempo gasto no momento da seleção espermática.

5 REFERÊNCIAS

A.A.; MACHADO, M.A.; VALE FILHO, V.R.; ANDRADE, V.J. Identificação do sexo de embriões bovinos fecundados *in vitro* e cultivados com células do *cumulus* na presença de soro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.407-409, 2003.

CAMARGO LSA, SÁ WF, FERREIRA AM, VIANA JHM, ARAÚJO MCC. Efeito de concentração espermática e período de incubação oócitoespermatozóide na fecundação *in vitro* em bovinos da raça Gir. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 37:709-715. 2003.

CESARI, A.; KAISER, G.G.; MICCI, N.; MUTTO, A.; VINCENTI, A.; FORNÉS, M.W.; ALBERIO, R.H. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production *in vitro*. **Theriogenology**, v.66, p.1185-1193, 2006.

DE VOS, A.; NAGY, Z.P.; VAN DE VELDE, H.; JORIS, H.; BOCKEN, G.; VAN STEIRTEGHEM, A. Percoll gradient centrifugation can be omitted in sperm

preparation for intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v.12, p.1980-1984, 1997.

HENKEL, R.R.; SCHILL, W.B. Sperm preparation for ART. **Reproduction Biology Endocrinology**, v.1, p.1-108, 2003.

KATO, Y.; NAGAO, Y. Effect of PVP on sperm capacitation status and embryonic development in cattle. **Theriogenology**, v.72, p.624-635, 2009.

MOUSSET-SIMÉON, N.; RIVES, N.; MASSE, L.; CHEVALLIER, F.; MACE, B. Comparison of six density gradient media for selection of cryopreserved donor spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.25, n.6, p.881-884, 2004.

RESENDE, M.V.; BEZERRA, M.B.; PERECIN, F.; ALMEIDA, A.O.; LUCIO, A.C.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Separation of x-bearing bovine sperm by centrifugation in continuous percoll and optiprep density gradient: effect in sperm viability and in vitro embryo production. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.2, p.581-587, 2009.