NUPEEC

Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária

Efeitos do volume de Percoll, duração e força de centrifugação na produção *in vitro* e proporção de sexos de embriões bovinos.

Machado, G. M. et. al 2009

- **Apresentadores: Fabrício Theobald**

  Rodrigo C. de C. de Azambuja
- **Co – orientação: Liziane Lemos Viana**
- **Orientação: Marcio Nunes Corrêa e Ivan Bianchi**

Theriogenology 71, 1289–1297, (2009).

Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos.

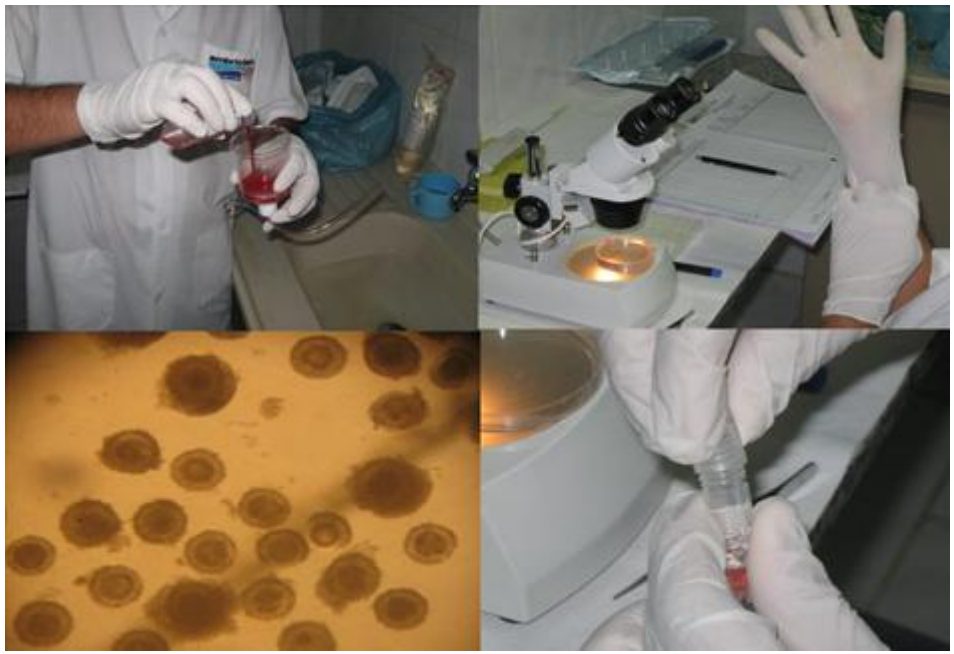
Machado[1 2], G.M.; Carvalho[1 2], J.O.; Siqueira Filho[1 2], E.; Caixeta[1 2], E.S.; Franco[1 2], M.M.; Rumpf[1 2], R.; Dode[1 2], M.A.N.

[1]Embrapa Recursos Genéticos e Biotecenologia/Laboratório de Reprodução Animal. Brasília , Brazil
[2]Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Veterinária, Brasília, Brazil

Fator de impacto: 1,9

Introdução

BRASIL



REFERÊCIA MUNDIAL NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES

Introdução

EMBRIÕES TRANFERIDOS NO BRASIL

60 MIL → **200 MIL**

ÚLTIMOS 5 ANOS

90 % PRODUZIDOS EM LABORATÓRIO

Introdução

Produção de embriões *in vitro*

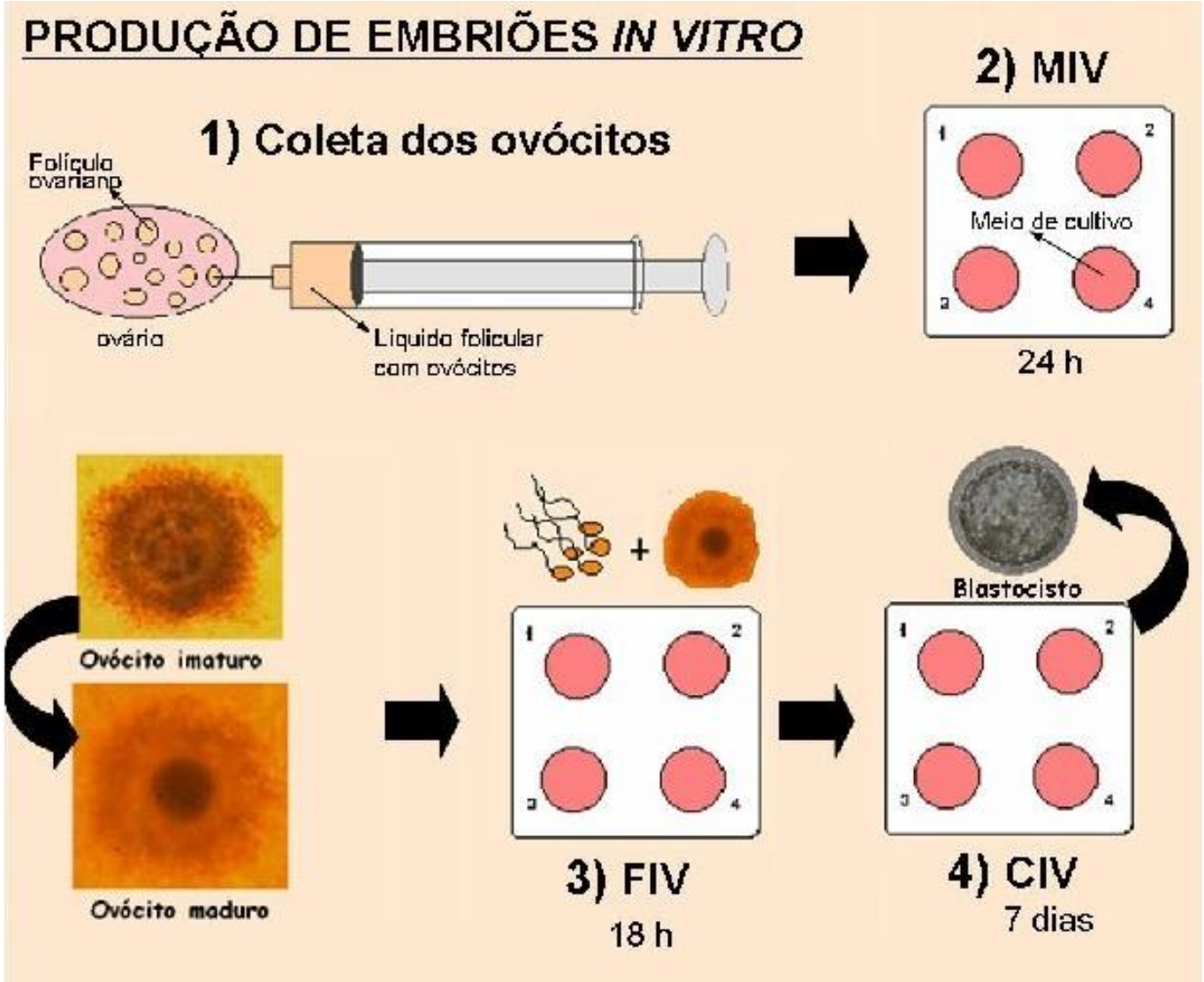
VANTAGENS

- **Produção de maior nº de filhos de animais superiores**
- **Menor intervalo entre as gerações**
- **Avaliação precoce do potencial genético dos animais**
- **Reprodução de animais de alto valor com problemas reprodutivos adquiridos**

ENTRAVES

- **Alto custo (Investimento)**
- **Mão-de-obra qualificada**
- **Requisitos mínimos**

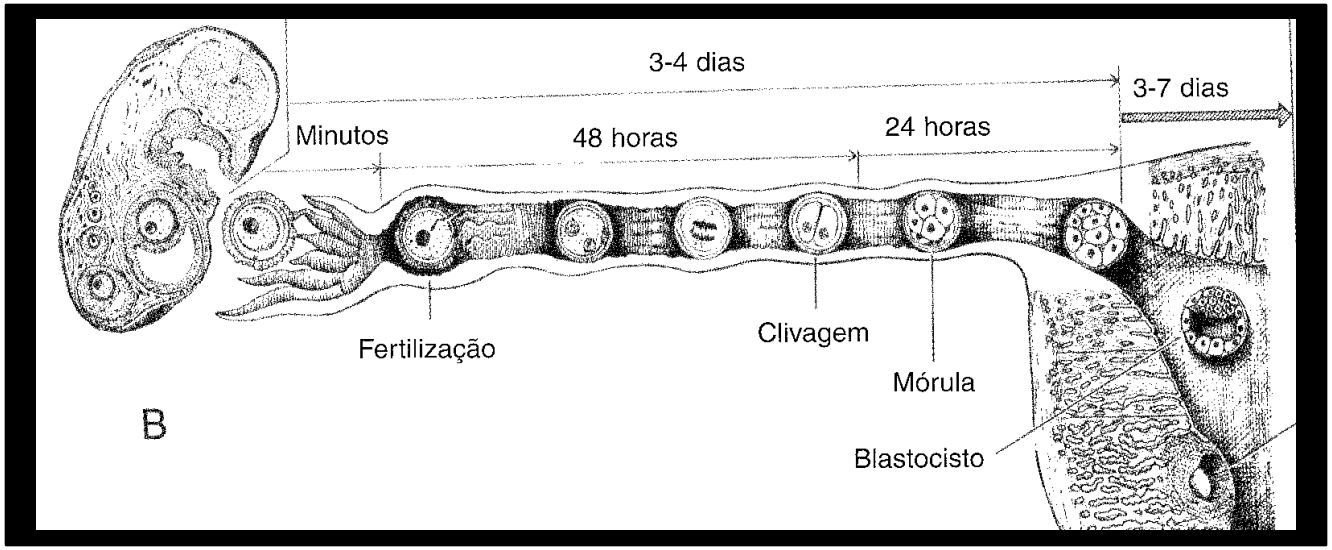
Introdução



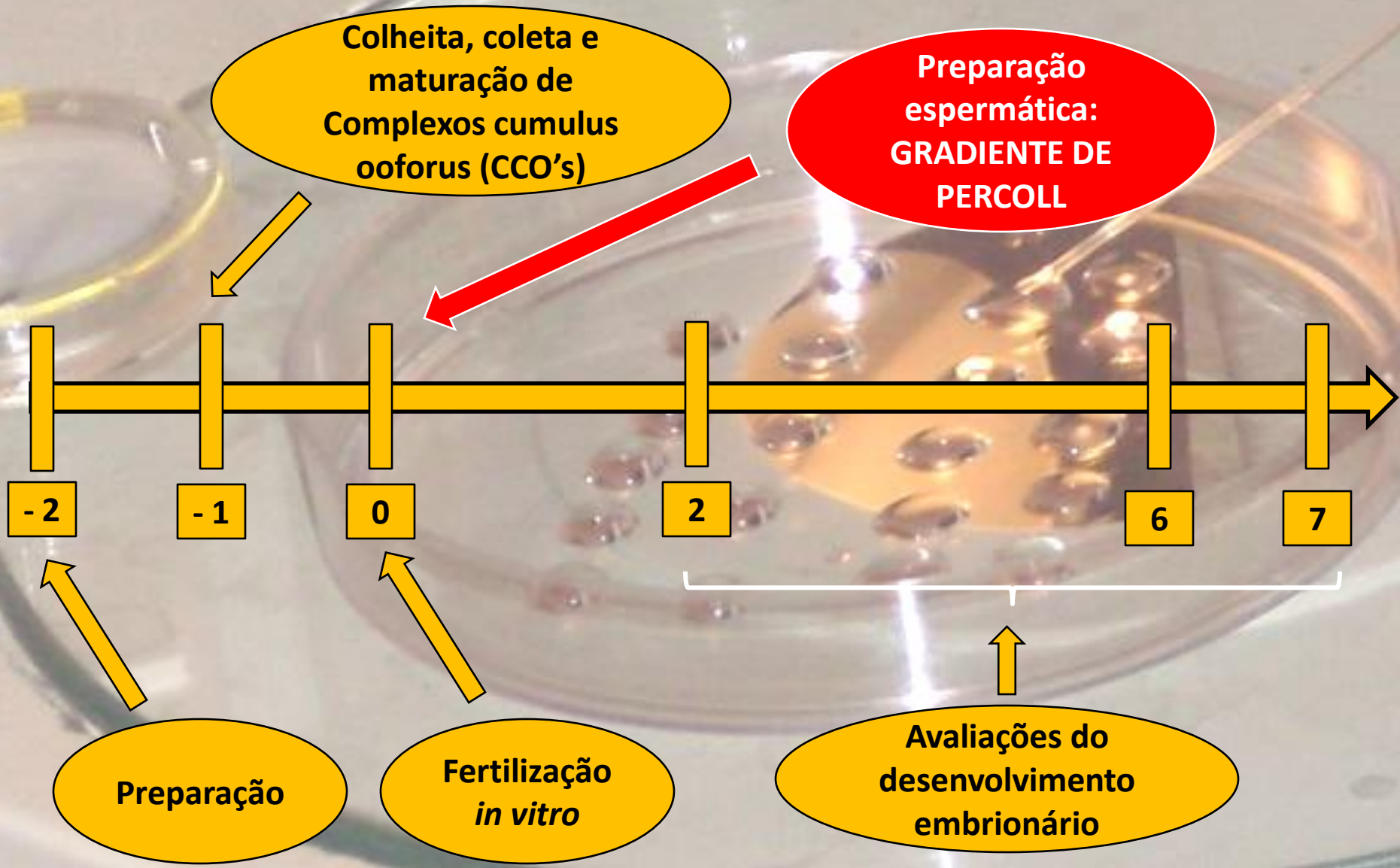
Fonte: Rheingantz, M. G . T.

Introdução

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO



Introdução


Colheita, coleta e maturação de Complexos cumulus ooforus (CCO's)
Preparação espermática: GRADIENTE DE PERCOLL
- 2
- 1
0
2
6
7
Preparação
Fertilização *in vitro*
Avaliações do desenvolvimento embrionário

Introdução

Percoll = Partículas de sílica coloidal recobertas com polivinil pirrolidona

1º

Percoll 45%

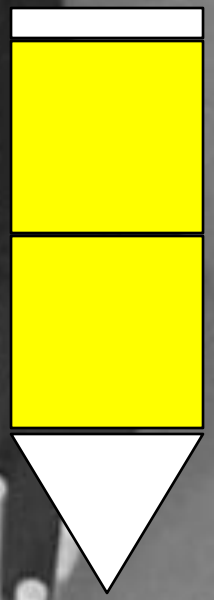
Percoll 90%

Centrifugado por 5 min à 5000 G

SÊMEN

2º

HEPES TALP



Centrifugado por 5 min à 5000 G

Introdução

Tem sido relatado:

GRADIENTE DE PERCOLL

- Melhora na motilidade;
- Melhora no % de céls normais;
- Melhora % de céls. com membrana intacta
- Melhora no % de céls. com acrossoma intacto

Por outro lado...

Força de centrifugação poderia causar danos a membrana e acrossoma

Introdução

Tem sido estudado:

GRADIENTE DE PERCOLL

- **Efeitos na PIV de embriões quando é utilizado um menor volume de Percoll e centrifugação a uma maior força, mas de curta duração;**
- **Interesse dos laboratórios de FIV, visando reduzir custos e tempo de preparação espermática.**

Quanto a proporção de sexos de embriões ...

- **Estabelecidas diferenças de massa, peso e densidade entre cromossomos X e Y (tamanho e conteúdo de DNA).**

- **Alterações propostas poderiam favorecer espermatozóides mais leves ou mais pesados**

Objetivos

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da força e duração da centrifugação, bem como o volume de Percoll, sobre a qualidade espermática, desenvolvimento embrionário e proporção sexual de embriões bovinos produzidos *in vitro.*

Materiais e métodos

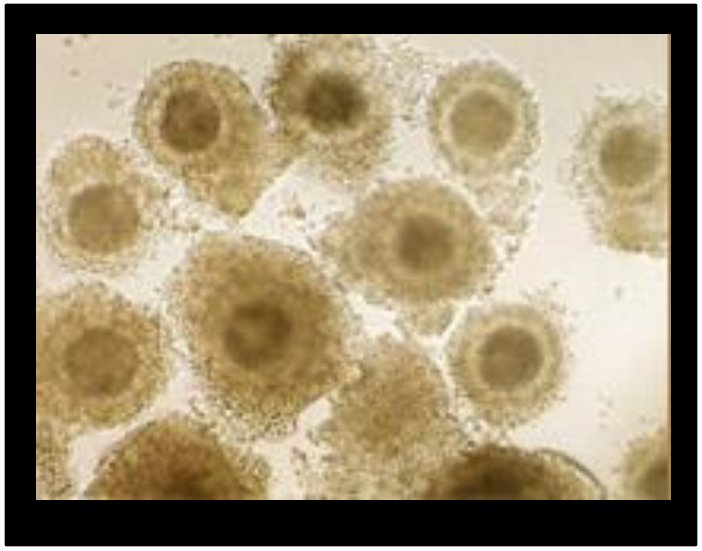
DIAS -1 :

Colheita, coleta e maturação dos CCO's

- Coletados frigorífico, transportados à 35° em NaCl 0,9 + Pen-Strep
- Aspirados folículos de 2 a 8 mm
- Seleção de cumulus ooforus e passagem para meio de maturação
- Maturação 22 horas a 39°C em 5% de CO2

- 2 **- 1**

Preparação



Materiais e métodos

DIA 0: Avaliações espermáticas (4 touros)

Motilidade	**% Subjetivo avaliado em microscópio de campo brilhante em aumento de 400 x**
Morfologia	**Microscópio de contraste de fase, em aumento de 1000 x, contadas 200 céls. e expresso em percentual**
Concentração	**Realizada por meio de hemocitômetro, resultados expressos em cél/ml.**

Materiais e métodos

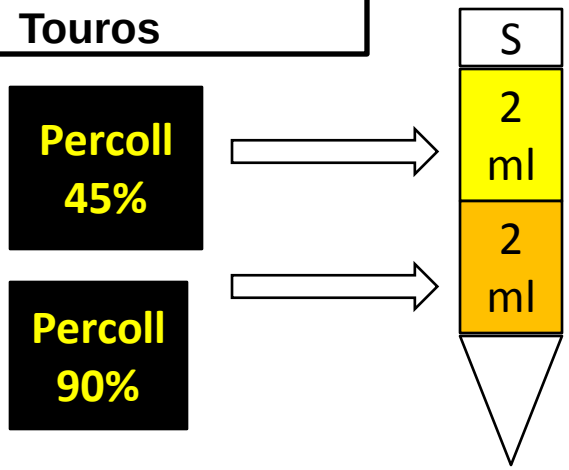
DIA 0: Avaliações espermáticas

Membrana plasmática	**Utilizando método do 6 – carbóxi – diacetato de fluoresceína**
Integridade acrossômica	**Utilizando método da lecitina do amendoim conjugada ao isotiocianato de fluoresceína**
Integridade da cromatina	**Utilizando método com Laranja de acridina**

Materiais e métodos

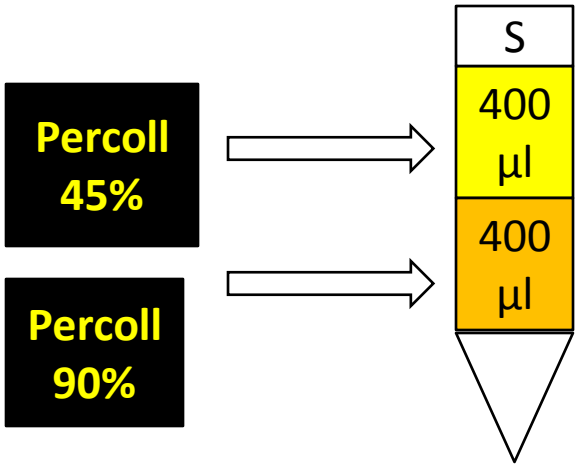
DIA 0: Sêmen dos 4 Touros

T 1



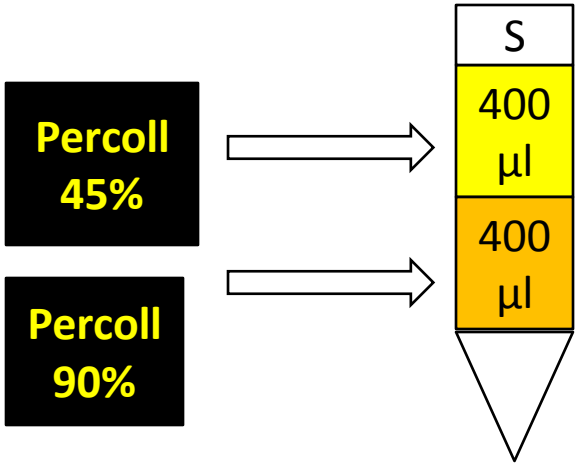
Centrifugado em tubo de 15 ml, por 20 min à 700 G

T 2



Centrifugado em microtubo de 4 ml , por 20 min à 700 G

T 3



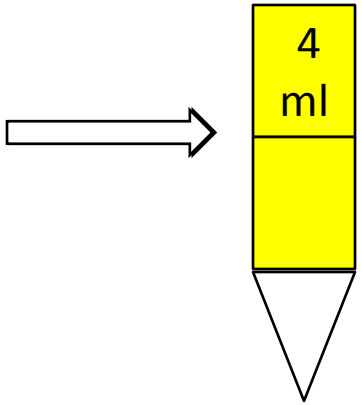
Centrifugado em microtubo de 4 ml , por 5 min à 5000 G

Materiais e métodos

DIA 0: Sêmen dos 4 Touros

T 1 e T2

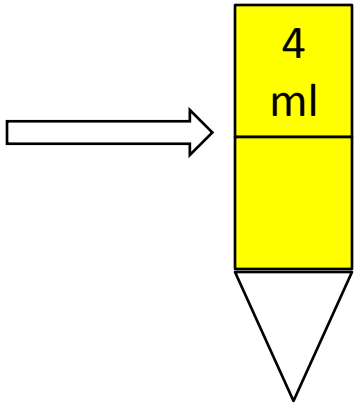
Sp TALP



Centrifugado em microtubo de 4 ml, por 5 min à 700 G

T 3

Sp TALP



Centrifugado em microtubo de 4 ml , por 5 min à 5000 G

Sedimento re-suspenso em 80 µl de sp TALP e sêmen utilizado para análise e FIV

Materiais e métodos

DIA 0 : FIV

Colheita, coleta e maturação de CCO's

- 2
- 1
0

Preparação

Fertilização *in vitro*

- **Transferência dos oócitos maturados para gotas de meio de fertilização**
- **Adição de sêmen ($1x10^6$/mL)**
- **Incubação por 20 horas a 39°C, com 5% de CO2**
- **Pós incubação transferidos para meio de cultivo**

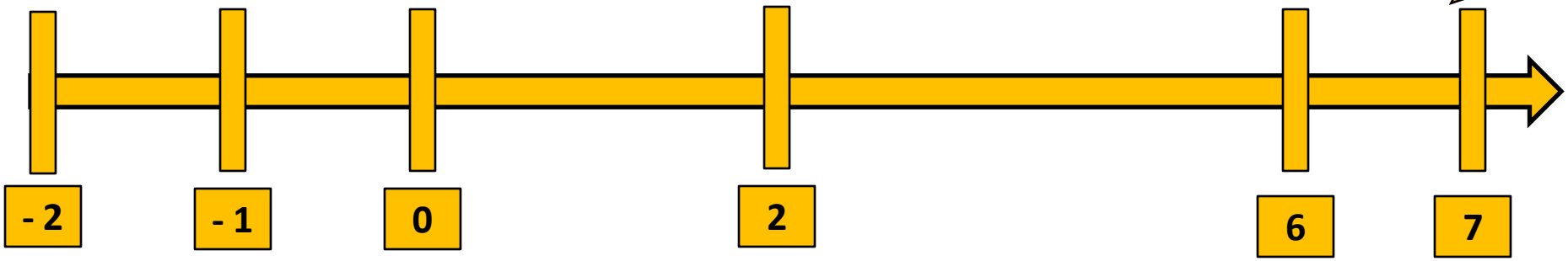
Cultivados em 39°C e 5% de CO2 no ar, durante 7 dias

Materiais e métodos

DIAS 2, 6 e 7: Avaliações das taxas clivagem e formação de blastocisto

Colheita, coleta e maturação de CCO's

Embriões sexados por meio de PCR



Preparação

Fertilização *in vitro*

Taxa de clivagem

Taxa de blastocisto

Resultados e Discussão

Tabela 1: Média total da motilidade e percentagens de espermatozóides bovino com morfologia normal, membrana intacta, acrossoma intacto e cromatina intacta antes e depois da passagem por um gradiente Percoll.

Tratamento	Motilidade total %	Morfologia normal %	Integridade de membrana %	Acrossoma intacto %	Cromatina intacta%
T0	41.3 ± 3.6a	83.8 ± 2.3a	44.7 ± 2.0a	42.8 ± 2.9a	97.1 ± 0.5a
T1	76.3 ± 3.1b	86.6 ± 2.8a,b	56.1 ± 3.2a,b	57.3 ± 3.3b	98.0 ± 0.4a,b
T2	77.9 ± 3.8b	89.2 ± 2.1b	57.6 ± 4.7b	47.9 ± 5.2a,b	98.2 ± 0.4b
T3	74.6 ± 4.0b	88.6 ± 2.4b	52.3 ± 3.9a,b	46.8 ± 4.9a,b	98.0 ± 0.5a,b

$P < 0.05$

Resultados e Discussão

Centrifugação

↑ Força ↓ Tempo = ↓ Força ↑ Tempo

↑ Motilidade

↓

Gradiente Percoll

↓

Seleção

- Bactérias
- Partículas do diluidor
- Espermatozóides com menor capacidade

Resultados e Discussão

Tabela 2: Média das características do esperma de bovinos (dos quatro touros), após centrifugação em Percoll.

Touros	Motilidade total %	Morfologia normal %	Integridade de membrana %	Acrossoma intacto %	Cromatina intacta%
1	83.9 ± 2.6a	85.6 ± 1.5a	64.6 ± 4.2a	62.2 ± 4.6a	98.9 ± 0.3a
2	80.8 ± 4.2a	94.3 ± 0.4b	55.5 ± 2.9a,b	55.5 ± 4.0a,b	99.4 ± 0.2a
3	55.4 ± 4.6b	77.8 ± 2.4a	47.9 ± 5.6b	39.0 ± 4.5b	96.3 ± 0.4b
4	60.4 ± 5.1b	94.7 ± 0.8b	53.4 ± 3.6a,b	45.9 ± 4.2a,b	97.6 ± 0.3b

$P < 0.05$

Resultados e Discussão

Tabela 3: Número e média (%) de embriões que sofreram clivagem e de blastocistos produzidos após FIV utilizando sêmen de três touros.

Touros	Número	Clivagem	Blastocistos (dia 6)	Blastocistos (dia 7)
1	512	438 (86 ± 1,6)a	135 (28 ± 2.9)a	233 (47 ± 2.6)a
2	340	294 (86 ± 2.1)a	69 (21 ± 4.9)a,b	130 (39 ± 6.6)a
3	342	222 (65 ± 5.9)b	34 (10 ± 2.5)b	59 (17 ± 4.2)b

P < 0.05

Resultados e Discussão

Resultados e Discussão

Por que alguns touros com atividade espermática satisfatória *in vivo* tem baixo desenvolvimento embrionário *in vitro*??

⇧ **Sensibilidade ao Percoll**

⇩

Altera a membrana plasmática

Capacitação espermática

Reação acrossômica

Precoce

⇩

⇩ **Produção embrionária**

Resultados e Discussão

Sexo do embrião:

Proporção esperada: 1:1

Touro 1 apresentou a proporção de 49 machos para 31 fêmeas no T1 (p<0,04)

4 mL Percoll por 20 min.

Volume de Percoll

Massa do cromossomo Y

Hiperativos no meio FIV

Capacitados rapidamente no meio FIV

Fertilizando + rápido o oócito que o cromossomo X

Conclusão

↓ Volume de Percoll

↓ Tempo de centrifugação

↑ Vigor centrifugação

Não afetaram

- Qualidade espermática
- Desenvolvimento embrionário
- Sexo do embrião

↓ Custos com materiais

↓ Tempo de preparação

MUITO OBRIGADO!

fabriciotheobald@gmail.com azambage@yahoo.com.br