

PERCOL *versus* MINI PERCOLL: EFEITO DO VOLUME DO GRADIENTE E A FORÇA DE CENTRIFUGAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*.

VIANNA, Liziane Lemos¹; PRADIEÉ, Jorgea²; ANGHINONI, Ledi³; CORRÊA, Marcio Nunes⁴; PEGORARO, Lígia M. Cantarelli⁵

¹ Méd. Vet., Mestranda em Veterinária – UFPEl

² Méd. Vet., MsC., Doutoranda em Veterinária – UFPEl

³ Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa - CPACT

⁴ Méd. Vet., Dr., Prof. Adjunto Fac. Veterinária – UFPEl

⁵ Méd. Vet., Dr., Pesquisadora da Embrapa – CPACT

lizianelv@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

A produção de embriões bovinos *in vitro* (PIV), é uma biotécnica bastante difundida em todo o mundo, entretanto ainda existem algumas limitações como por exemplo, a baixa resistência a congelamento, desvio na proporção sexual dos embriões (PEGORARO et al., 1998; CARBONNEAU et al., 1999) e, principalmente, os resultados de desenvolvimento embrionário a baixo do desejado (GONÇALVES, P.B.D. ET AL., 2008)

Em condições *in vivo*, os espermatozoides com potencial fertilizante são selecionados no momento da passagem destes pelo trato reprodutivo da fêmea. Porém quando se utiliza uma técnica de reprodução assistida, esta etapa precisa ser feita artificialmente. Com isso, várias técnicas têm sido criadas para a seleção espermática (HENKEL & SCHILL, 2003).

Nos laboratórios de PIV em bovinos, os métodos de preparação espermática mais utilizados são do gradiente de densidade de percoll e o de migração ascendente (swim-up) (CESARI et al., 2006; PALMA, 2008). A finalidade de ambas as técnicas é selecionar os espermatozoides de acordo com sua motilidade e separar os mesmos do plasma seminal e dos diluentes utilizados na criopreservação (PALMA, 2008).

O objetivo do nosso trabalho foi comparar a taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário, a partir da utilização do gradiente de densidade de percoll em dois volumes diferentes, com a mesma força de centrifugação e tempos de centrifugação distintos.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Para o trabalho foram utilizados complexos cumulus oócitos (CCOs) oriundos de ovários de vacas de abatedouro. Os ovários foram coletados logo após o abate dos animais e transportados ao laboratório em solução de 0,9% de NaCl suplementado com gentamicina, a 35°C.

No laboratório, somente os folículos com diâmetro entre 2 a 8mm foram aspirados com o auxílio de uma bomba de vácuo contínuo. Os CCOs, juntamente com o líquido folicular foram armazenados em tubos de poliestireno de 15ml e mantidos a 30°C até o momento da procura e seleção em esteriomicroscópio. Somente foram utilizados os CCOs que apresentaram homogêneo citoplasma e

com várias camadas de células do cumulus. Após a seleção, estes foram divididos em grupos e colocados para maturar em meio próprio por 22 horas.

Após a maturação, foi realizada a fecundação *in vitro* (FIV). Para a seleção espermática utilizamos o gradiente de percoll 90% (solução estéril de sílica coloidal recoberta com polivinilpirrolidona) em dois diferentes volumes e tempos de centrifugação. Percoll (P): em um tubo de poliestireno de 15ml colocamos 2ml do gradiente a 90% e acima 2ml do a 45%. Mini percoll (MP): em um eppendorf foi colocado 400µl do a 90% e 400µl do a 45%. Para preparar o gradiente a 45%, diluímos na proporção de 1:1 este com o meio Sp-TALP. No momento da FIV o sêmen foi descongelado e adicionado sobre os gradientes e levado a centrifugação, P (700xg por 20 minutos) e MP (700xg por 5 minutos). Após a centrifugação foi retirado o sobrenadante e os *pellets* suspensos em 2ml (P) e 400µl (MP) do meio Sp-TALP e levados a uma nova centrifugação ambas a 700xg por cinco minutos. Após a segunda centrifugação os novos *pellets* foram suspensos em meio FIV. No momento da FIV os CCOs foram transferidos diretamente para uma placa contendo meio de fecundação e posteriormente inseminados. A dose inseminante foi estipulada a partir da motilidade espermática após o tratamento, a concentração espermática e o volume da gota. Para os dois tratamentos foi utilizado sêmen congelado do mesmo touro e da mesma partida.

Considerando o dia da fecundação como dia zero (D0), em D1, os possíveis zigotos foram transferidos para o meio SOF (meio de cultivo), e neste permaneceram até o D8. No D2 foi avaliada a taxa de clivagem e em D7 e D8 o desenvolvimento embrionário, considerando viáveis, os embriões que estivessem em estágio de desenvolvimento condizentes com o dia. A maturação, a fecundação e o cultivo foram realizados em estufa a 39°C, com 5%CO₂ e umidade saturada.

Para análise estatística foi utilizado o teste do Qui-quadrado, comparando a taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário e considerando 5% de nível de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na tabela 1 podemos observar que os tratamentos diferiram quanto à taxa de clivagem e no rendimento global (desenvolvidos em D8/ inseminados). Já para o desenvolvimento em D7 e D8 (desenvolvidos em D7 ou D8/ clivados) não houve diferença estatística.

O percoll é o gradiente de densidade mais utilizado atualmente para a preparação espermática, devido à alta qualidade na seleção do espermatozóides viáveis. Porém existe uma grande variação nos protocolos utilizando este gradiente (SONFAI et al.,2002)

Machado et al. (2009), quando comparou o desenvolvimento embrionário utilizando percoll (45 e 90%), nos mesmos volumes utilizados neste estudo, porém com tempo e força de centrifugação diferente para o MP (20min/700xg), não encontrou diferença para a taxa de clivagem e rendimento global, diferente do que foi encontrado neste estudo. Com isso, acredita-se que o baixo rendimento do MP é devido à baixa força associada ao curto tempo de centrifugação.

Tabela 1: Taxa de clivagem, desenvolvimento em D7 e D8 e rendimento global nos tratamentos.

Tratamento	Taxa de clivagem	Desenvolvimento em D7	Desenvolvimento em D8	Rendimento global
Percoll	80% (363/478) ^a	26% (95/363) ^a	28% (102/363) ^a	21% (102/478) ^a
Mini percoll	67% (326/485) ^b	24% (79/326) ^a	23% (75/326) ^a	15% (75/485) ^b

Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente (P>0,05)

4 CONCLUSÕES

A utilização do mini percoll diminuiria o tempo gasto no momento da seleção espermática, facilitando assim, para as empresas do ramo. Porém, a centrifugação a 700xg não apresentou resultados satisfatórios, devendo então serem testadas outras velocidades de centrifugação com o objetivo de atingir resultados semelhantes ou melhores que o do percoll.

5 REFERÊNCIAS

- CARBONNEAU, G.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; DUROCHER, J.; BOUSQUET, D. Factors affecting the sex ratio of in-vitro and in-vivo produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.51, p. 396, 1999. (abstract)
- CESARI, A.; KAISER, G. G.; MUCCI, N.; MUTTO, A.; VICENTI, A. FORNE`S, M. W.; ALBERIO, R. H. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. **Theriogenology**, v. 66, p.1185-93, 2006.
- GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SIQUEIRA, L. C.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Ciênc. Vet. Trop.**, v.11, p.135 – 138, 2008.
- HENKEL, R.E; SCHILL, WB. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1 p.108 – 129, 2003.
- MACHADO, G. M.; CARVALHO, J. O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E. S.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R.; DODE, M. A. N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio os bovine embryos. **Theriogenology**, v.71, p.1289-97, 2009.
- SOMFAI, T.; BODO, S. et al. Effect of swim up and percoll treatment on viability and acrossome integrity of frozen-thawed Bull spermatozoa. **Reprod Domest Anim**, v.37, p.285-90, 2002.

PEGORARO, L. M. C.; RHEINGANTZ, M. G. T.; PALMA, G. A. Selección del sexo em mamíferos. In: **Biología de la Reproducción**. Mar del Plata: Rebiotec, 2008, p.415-45.

PALMA, G. A. Producción in vitro de embriones bovinos. In: **Biología de la Reproducción**. Mar del Plata: Rebiotec, 2008, p.313-75.