

**Efeito de diferentes meios de cultivo no desenvolvimento e proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro***

[Effect of different culture media on development and sex ratio of bovine embryos fertilized *in vitro*]

S.G.T. Gilardi<sup>1</sup>, W.F. Sá<sup>2\*</sup>, L.S.A. Camargo<sup>2</sup>, A.M. Ferreira<sup>2</sup>, M.A. Machado<sup>2</sup>,  
R.V. Serapião<sup>3</sup>, A.B.M. Soares<sup>4</sup>, T.G. Pinho<sup>5</sup>, J.H.M. Viana<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mestre em Medicina Veterinária

<sup>2</sup>Embrapa Gado de Leite

Rua Eugênio do Nascimento, 610

36038-330 - Juiz de Fora, MG

<sup>3</sup>Estudante de Doutorado - UENF, Campos dos Goytacazes, RJ

<sup>4</sup>Departamento de Estatística - UFF - Niterói, RJ

<sup>5</sup>Faculdade de Veterinária - UFF - Niterói, RJ

**RESUMO**

Avaliou-se o efeito da suplementação de meios de cultivo sobre o desenvolvimento e proporção do sexo de embriões bovinos fertilizados *in vitro*. Complexos *cumulus*-oócitos obtidos de ovários de matadouro foram maturados e fertilizados *in vitro*. Os zigotos (n= 484) foram distribuídos aleatoriamente em meio CR2aa, contendo soro fetal bovino (SFB) (T<sub>1</sub>), albumina sérica bovina (BSA) (T<sub>2</sub>) ou BSA mais insulina:transferrina:selênio e vitaminas (BSA+) (T<sub>3</sub>), no cultivo embrionário *in vitro*, a uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 38,8°C em ar. A taxa de clivagem foi observada 72-76 horas pós-fertilização (PF) e a taxa de blastocistos com sete e oito dias PF. Os blastocistos (n= 63) foram sexados pela técnica de reação em cadeia de polimerase. A taxa de clivagem em T<sub>2</sub> foi maior (P<0,05) do que em T<sub>1</sub> e T<sub>3</sub>. A taxa de blastocistos foi similar (P>0,05) entre T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>, porém menor (P<0,01) do que em T<sub>1</sub>. A proporção do sexo dos embriões não diferiu (P>0,05) entre os tratamentos. O T<sub>1</sub> influenciou o desenvolvimento de blastocistos, mas não teve efeito sobre a proporção do sexo.

Palavras-chave: bovino, cultivo embrionário, sexagem

**ABSTRACT**

The effect of culture media on the development and on the sex ratio of bovine embryos fertilized *in vitro* was studied. Cumulus oocyte-complexes from slaughterhouse ovaries were matured and fertilized *in vitro*. Zygotes (n= 484) were randomly allotted to different culture media and cultured with their cumulus cells in CR2aa medium and an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air at 38.8°C. The fetal calf serum (FCS), bovine seric albumin (BSA) or BSA plus insulin:transferrin:selenium and vitamins (BSA+) supplementation effect on embryo culture was evaluated. Cleavage rate was assessed at 72-76h post-fertilization (PF) and blastocyst rate on days 7 and 8 PF. The blastocysts (n= 63) were also sexed using polymerase chain reaction. Cleavage rate for BSA medium supplemented was higher (P<0.05) than FCS and BSA+. Blastocyst rates for BSA and BSA+ media were similar (P>0.05), but lower (P<0.01) than FCS. Culture medium FCS supplemented affected blastocyst development but not the sex ratio.

Keywords: bovine, embryo culture, sexing

---

Recebido para publicação em 19 de agosto de 2003

Recebido para publicação, após modificações, em 9 de junho de 2004

\*Autor para correspondência

e-mail: wandefsa@cnpqgl.embrapa.br

## INTRODUÇÃO

O meio de cultivo utilizado na produção *in vitro* de embriões afeta o desenvolvimento após a fecundação, interferindo no metabolismo ou na expressão de genes importantes para o desenvolvimento do embrião (Bavister, 1995; Niemann e Wrenzycki, 2000). A composição do meio de cultivo *in vitro*, utilizado nos primeiros sete dias de vida, pode influenciar o desenvolvimento embrionário, fetal e placentário em bovinos.

Argumenta-se, ainda, que componentes dos meios de cultivo podem afetar a sobrevivência de embriões femininos, alterando a proporção do sexo (Rieger, 1992; Kochhar et al., 2001), o que pode explicar o número superior de bezerras machos nascidos de embriões produzidos *in vitro*. Porém, é difícil chegar a uma conclusão clara pela literatura, já que os resultados são conflitantes. Alguns estudos não mostraram diferença na proporção do sexo (Carvalho et al., 1995), porém na maioria deles o número de embriões machos foi superior (Gutiérrez-Adán et al., 1996; Lonergan et al., 1999).

Identificadas as condições de cultivo que levam ao desvio na proporção de 1:1 do sexo, seria possível conhecer os fatores que controlam o desenvolvimento de machos e fêmeas (Lonergan et al., 1999), contribuindo para o desenvolvimento de um método que altere essa proporção nos embriões produzidos para transferência comercial. O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito de diferentes meios de cultivo, adicionados após a fertilização, sobre a taxa de desenvolvimento e proporção do sexo de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) foram obtidos de ovários coletados em matadouro e transportados em solução fisiológica para o laboratório. CCOs com células do *cumulus* compactas e com no mínimo três camadas foram maturados *in vitro* em 400µl de *Tissue Culture Medium* (TCM 199) adicionados de 20µg/ml de hormônio folículo estimulante (FSH) e 10% de soro de vaca em estro, em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> com 95% de umidade e temperatura de 38,8°C, por 22 a 24h.

Após a maturação os CCOs foram transferidos para o meio de fecundação em microgotas de 100 a 150µl, sob óleo mineral, na concentração espermática de 2,0-2,5×10<sup>6</sup> espermatozoides/ml, onde permaneceram por 20-22h, nas mesmas condições da maturação.

Após a fertilização os possíveis zigotos (n= 484) foram distribuídos aleatoriamente nos diferentes tratamentos. Todos foram cultivados em gotas de 50µl cobertas com óleo mineral. O meio foi renovado pela metade 72 horas após o início do cultivo. O experimento consistiu de três tratamentos contendo meio *Charle Rosenkrans 2* (CR2) suplementado com aminoácidos (CR2aa) em monocamada das células do *cumulus*. No tratamento 1 (T<sub>1</sub>) adicionaram-se 10% de soro fetal bovino (SFB), no tratamento 2 (T<sub>2</sub>) adicionou-se 1mg/ml de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA<sub>lag</sub>) e no tratamento 3 (T<sub>3</sub>) 1mg/ml de BSA<sub>lag</sub> suplementado com 50µl de insulina:transferrina:selênio (ITS) e 50µl de *basal medium of eagle* (BME)-vitaminas. O cultivo foi realizado à temperatura de 38,8°C e 95% de umidade, com 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico. Avaliou-se a taxa de clivagem com 72 horas pós-fertilização (PF) e a taxa de blastocistos no sétimo e oitavo dias PF.

Os blastocistos (=63) foram separados e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido). Em seguida foram lavados em meio *Phosphate Buffered Solution* (PBS) com 0,4% de BSA e acondicionados em tubos para reação em cadeia de polimerase (PCR), devidamente identificados, contendo 10µl de uma solução tampão de PCR 10x (100mM Tris, 500mM KCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>) e proteinase K (1,5mg/ml) e armazenados em freezer a -20°C. Para extrair o DNA dos embriões, os tubos foram incubados posteriormente a 50°C, durante uma hora, para a ação da proteinase K. Em seguida adicionaram-se ao conteúdo do tubo 9µl de uma mistura de reação contendo tampão PCR 1x, 200µM de dNTP, 0,5µM de cada *primer* e 1U de Taq polimerase, totalizando 20µl. Para a reação de PCR foram utilizados dois pares de *primers* simultaneamente, um específico para cromossomo Y bovino (BRY.4a) e outro específico para um cromossomo autossômico (Satellite 1709) (Avery et al., 1992). Os

### Efeito de diferentes meios de cultivo...

parâmetros da reação de PCR foram 40 ciclos, consistindo de desnaturação a 95°C por um minuto, ligação dos *primers* a 56°C por 30 segundos e polimerização a 72°C por um minuto. Passadas essas etapas, os tubos foram deixados a 72°C durante 10 minutos e, então, mantidos a 4°C até a hora do uso.

Após o PCR, os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, por duas horas a 70 volts. O gel foi corado em solução contendo 3µg/ml de brometo de etídio por 30 minutos e, posteriormente, avaliado sob luz ultra-violeta. A fotodocumentação do gel foi realizada no equipamento EagleEye II<sup>1</sup>.

A avaliação das taxas de clivagem, blastocistos e

sexagem dos embriões baseou-se no teste exato de Fisher.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à taxa de clivagem e ao desenvolvimento embrionário são apresentados na Tab. 1. Observou-se maior taxa de clivagem para os meios que continham BSA. Apesar de alguns autores não terem encontrado diferenças na clivagem entre meios de cultivo suplementados com SFB ou BSA (Tricoire et al., 1999), outros descreveram que a presença de SFB deprimiu a taxa de clivagem (Gutiérrez-Adán et al., 2001). Os resultados deste trabalho sinalizam para o efeito inibitório inicial do SFB nas primeiras clivagens.

Tabela 1. Taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário em meio CR2aa suplementado com soro fetal bovino (T1), albumina sérica bovina (T2) e albumina sérica bovina adicionado de vitaminas e insulina-transferrina-selênio (T3)

Tratamento	Nº de oócitos	Clivagem n (%)	Blastocistos - dia 7 PF n (%)	Blastocistos - dia 8 PF n (%)
T1	160	82 (51,3%)a	37 (45,1%)D	51 (62,2%)D
T2	165	111 (67,3%)b	6 (5,4%)E	10 (9,0%)E
T3	159	96 (60,4%)c	3 (3,1%)E	12(12,5%)E

Valores seguidos por letras distintas na coluna diferem entre si (P<0,05) (minúsculas, P<0,05; maiúsculas, P<0,01). PF: pós-fertilização

A produção de blastocistos nos dias sete e oito PF foi maior (P<0,01) no meio adicionado com SFB do que nos meios com BSA ou BSA suplementado com ITS e vitaminas. Estes, contudo, não diferiram (P>0,05) entre si. Estudos têm mostrado efeito favorável do SFB no desenvolvimento de embriões bovinos (Van Langendonck et al., 1997), levando a uma produção maior de embriões, inclusive quando comparado com a BSA (Gomez e Diez, 2000). Resultados do presente trabalho confirmam o efeito bifásico do SFB, conforme citado por Bavister (1995), deprimindo a clivagem inicial e estimulando o desenvolvimento dos embriões cultivados *in vitro* até o estágio de blastocisto. Não se conhece o mecanismo de estimulação do soro nessa etapa do desenvolvimento embrionário, porém esse estímulo é consistente

com a ação de fatores de crescimento e/ou de aminoácidos, que estariam presentes nesse mecanismo, ou, ainda, com suas propriedades antioxidantes que reduzem a formação de superóxidos (Bavister, 1995). A BSA beneficia a clivagem dos embriões, porém parece ter deficiência de elementos estimuladores do desenvolvimento de blastocistos (Tricoire et al., 1999), fato observado no presente experimento (Tab. 1).

A adição de vitaminas e ITS ao meio suplementado com BSA não aumentou a taxa de produção de blastocistos. O mesmo foi observado por Camargo et al. (2001), quando utilizaram ITS e vitaminas separadamente em meio de cultivo com SFB. Isso pode ser atribuído a diferenças nas necessidades biológicas de

<sup>1</sup>Stratagene Corp.

embriões bovinos em relação às espécies estudadas. Estas diferenças podem ocorrer em relação ao efeito individual de cada vitamina e às concentrações adicionadas ao meio de cultivo. Em camundongos, por exemplo, o número total de células por blastocisto foi reduzido quando cultivados em meio suplementado com niacinamida em quantidades fisiológicas (0,5µM) ou presentes no meio Ham's F-10 (5,0µM) (Tsai e Gardner, 1994), enquanto a mesma substância na concentração de 5,0µM bloqueou o desenvolvimento de embriões de hamster (McKiernan e Bavister, 2000). Matsui et al. (1995), ao utilizarem ITS na concentração de 1%, observaram ação estimulatória no desenvolvimento de embriões bovinos. Este trabalho utilizou 50µl de vitaminas e ITS, o que pode representar um excesso ou uma deficiência dessas substâncias no desenvolvimento embrionário bovino *in vitro*. Além disso, a BSA pode apresentar contaminação por vitaminas (Bavister, 1995), alterando a concentração final no meio de cultivo.

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) na proporção total de machos e fêmeas em relação aos meios de cultivo utilizados, bem como nos blastocistos observados nos dias sete e oito (Tab. 2). Alguns autores descreveram aumento na proporção de embriões machos (Lonergan et al., 1999), sendo esse efeito atribuído à presença do SFB (Gutiérrez-Adán et al., 2001). Supõe-se que embriões machos possuam metabolismo diferenciado quando no cultivo em certas condições, como na presença de SFB, o que provocaria desenvolvimento embrionário mais acelerado quando comparado com o de embriões femininos (Gutiérrez-Adán et al., 1996), com conseqüente melhor qualidade e seleção de mais embriões masculinos. No presente estudo não se observou efeito do SFB e dos outros tratamentos no desenvolvimento de embriões femininos ou masculinos, mantendo a proporção de 1:1 em embriões com sete ou oito dias pós-fertilização. Carvalho et al. (1995) também não encontraram diferença na proporção de embriões masculinos e femininos fecundados *in vitro*.

Tabela 2. Proporção de sexo no desenvolvimento embrionário em meio de cultivo suplementado com soro fetal bovino (T1), albumina sérica bovina (T2) e albumina sérica bovina adicionado de vitaminas e insulina-transferrina-selênio (T3)

Tratamento	Blastocistos dia 7		Blastocistos dia 8		Total	
	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
	T1	19	18	2	4	21(48,8%)
T2	2	2	2	3	4 (44,5%)	5 (55,5%)
T3	0	2	5	4	5 (45,5%)	6 (54,5%)
Total	21 (48,8%)	22 (51,2%)	9 (45,0%)	11 (55,0%)	30 (47,6%)	33 (52,4%)

( $P>0,05$ ).

### CONCLUSÕES

O SFB mostrou efeito bifásico, deprimindo a clivagem inicial e estimulando o desenvolvimento embrionário posterior, enquanto a BSA beneficiou a clivagem dos embriões.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVERY, B.; JORGEMSEN, C.B.; MAIDSON, V. et al., Morphological developmental and sex of bovine in vitro fertilized embryos. *Mol. Reprod. Develop.*, v.32, p.265-270, 1992.

BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum. Reprod. Update*, v.1, p.91-148, 1995.

CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M. et al. Cultivo in vitro de embriões bovinos em meio suplementado com citrato, taurina, insulina ou vitaminas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2001, Salvador. *Anais...* Salvador: Conselho Federal de Medicina Veterinária, 2001. p.251-252.

CARVALHO, R.V.; DEL CAMPO, M.R.; PLANTE, Y. et al. Effects of stage of development on sex ratio and survival after freezing of day 7 bovine IVF embryos.

*Efeito de diferentes meios de cultivo...*

*Theriogenology*, v.43, p.183, 1995.

GOMEZ, E.; DIEZ, C. Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, v.58, p.23-37, 2000.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; BEHBOODI, E.; ANDERSON, G.B. et al. Relationship between stage of development and sex of bovine IVF embryos cultured in vitro versus in the sheep oviduct. *Theriogenology*, v.46, p.515-525, 1996.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D. et al. Effect of the in vitro culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*, v.55, p.1117-1126, 2001.

KOCHHAR, H.P.S.; PEIPPO, J.; KING, W.A. Sex related embryo development. *Theriogenology*, v.55, p.3-14, 2001.

LONERGAN, P.; KHATIR, H.; PIUMI, F. et al. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J. Reprod. Fertil.*, v.117, p.159-167, 1999.

MATSUI, M.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M. et al. Stimulatory effects of insulin on the development of bovine embryos fertilized in vitro. *J. Vet. Med. Sci.*, v.57, p.331-336, 1995.

McKIERNAN, S.H.; BAVISTER, B.D. Culture

of one-cell hamster embryos with water soluble vitamins: pantothenate stimulates blastocyst production. *Hum. Reprod.*, v.15, p.157-164, 2000.

NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*, v.53, p.21-34, 2000.

RIEGER, D. Relationship between energy metabolism and development of early mammalian embryos. *Theriogenology*, v.37, p.75-93, 1992.

TRICOIRE, H.; TOUZÉ, J.L.; MERMILLOD, P. Effect of fetal calf serum on the quality of in vitro produced cattle embryos. *Theriogenology*, v.51, p.257, 1999.

TSAI, F.C.; GARDNER, D.K. Nicotinamide, a component of complex culture media, inhibits mouse embryo development in vitro and reduces subsequent developmental potential after transfer. *Fertil. Steril.*, v.61, p.376-382, 1994.

VAN LANGENDONCKT, A.; DONNAY, I.; SCHUURBIERS, N. et al. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *J. Reprod. Fertil.*, v.109, p.87-93, 1997.