

RECUPERAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES, CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO IN VITRO EM BOVINOS¹

SPERM RECOVERY, SPERMATIC CAPACITATION AND IN VITRO EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT IN THE BOVINE

Autor: Christine Marie Schweitzer²

Comissão Examinadora: Paulo Bayard Dias Gonçalves³

Valquíria Hyppolito Barnabe⁴

Carlos Miguel Jaime Eggleton⁵

Este trabalho foi delineado com o objetivo principal de incrementar a produção de embriões bovinos a partir da maturação de oócitos, fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro*. As diferentes etapas destas técnicas foram investigadas de uma maneira progressiva, iniciando pela recuperação de espermatozóides viáveis e pelo efeito da heparina na capacitação espermática e clivagem. Desenvolveu-se um método modificado do percol, o qual foi comparado com os métodos tradicionais de percol e *swim up*. As principais modificações consistiram na diluição do percol em SPERM-TL em concentrações de 45% e 90% e na incubação do sêmen por 30 minutos em banho maria a 37°C, na presença de 10µg de heparina/ml. No momento da fecundação, os gametas foram co-incubados na presença ou ausência de heparina de acordo com as diferentes técnicas de recuperação de espermatozóides viáveis. Quando verificou-se a influência do percol na capacitação,

incubou-se os espermatozóides recuperados pelas técnicas do *swim up* e percol em concentrações de heparina de 0, 1, 5, 10, 50 e 100µg/ml. Os parâmetros avaliados foram motilidade, vigor e recuperação espermática, fecundação e clivagem. Posteriormente, verificou-se o efeito de diferentes concentrações de TCM199 (18%, 36%, 54%, 72%, 90%) no desenvolvimento embrionário. No TCM199 36%, foram acrescentados aminoácidos e comparados seus resultados de desenvolvimento embrionário ao TCM199 36% e ao KSOM. Em outro experimento, verificou-se a relação do volume do meio de cultivo no desenvolvimento embrionário, onde foram utilizados os volumes de 25, 50, 100, 200 e 500µl de TCM199 36%. A seguir, foram avaliados os diferentes volumes de TCM199 36% variando a concentração de aminoácidos nos diferentes períodos de desenvolvimento embrionário. O percol demonstrou ser superior ao *swim up* aumentando a motilidade e a

¹Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Fisiopatologia da Reprodução, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em 19.03.96, financiada pela FAPERGS.

²Médico Veterinário, Pós-graduando em Medicina Veterinária, UFSM.

³Médico Veterinário, PhD, Professor Adjunto, UFSM.

⁴Médico Veterinário, Doutor, Professor Titular, USP, São Paulo.

⁵Médico Veterinário, Doutor, EMBRAPA/CCPSUL, Bagé, RS.

recuperação de espermatozóides com boa habilidade de fecundar e longa sobrevivência. Verificou-se que a concentração de 10µg de heparina/ml, durante a fecundação *in vitro*, não foi suficiente para inibir a formação de pró-núcleo e clivagem. Da mesma maneira, observou-se que o percol facilita a capacitação dos espermatozóides, requerendo menores concentrações de heparina. A melhor concentração de TCM199 no desenvolvimento embrionário foi de 36% com 2,2mM de glicose. Quando avaliou-se a concentração de aminoácidos no meio, verificou-se que a medida que os embriões chegam ao estágio de blastocisto requerem concentrações maiores de aminoácidos. Também foi demonstrado que não há efeito do volume de meio no desenvolvimento embrionário.

Palavras-chaves: FIV, capacitação espermática, percol, 'swim up', desenvolvimento embrionário.

The aim of the present work was to increase the production of bovine embryos using *in vitro* maturation, fertilization and embryo development, investigating the different stages of these techniques. Initially, the recovery of viable sperm and the effect of heparin in spermatid capacitation and cleavage were examined. A modified method, using Percoll, for viable sperm recovery was developed and compared to the used methods of Percoll and swim up. The main modifications were to use SPERM-TL for diluting the Percoll and to incubate the sperm in the presence of 10µg of heparin/ml in a water bath at 37°C for 30 minutes. At the moment of fertilization, the gametes were incubated in the presence or absence of heparin

in according to the different techniques. When the effect of Percoll in the sperm capacitation was examined, sperm were incubated in the presence of 0, 1, 5, 10, 50 and 100µg/ml concentrations of heparin. The parameters investigated were spermatid motility, vigor and recovery, fertilization and cleavage. TCM199 was diluted (18%, 36%, 54%, 72%, 90%) to verify the influence in the embryonic development. In TCM199 36% was added amino acids and the results of embryonic development were compared with those of the TCM199 36% without added amino acids and KSOM. In another experiment, the consequence of the culture media volume in the embryonic development was determined using 25, 50, 100, 200 and 500µl of TCM199 36%. Subsequently, those volumes were evaluated varying the amino acids concentrations during embryonic development. The Percoll technique was superior to swim up, increasing the spermatid motility and recovery of sperm with both good ability to fecundate and long-life. It was verified that the concentration of 10µg of heparin/ml during *in vitro* fertilization was not enough to inhibit the pronuclei formation and cleavage. Sperm recovered by Percoll technique are easily capacitated, requiring lower concentrations of heparin. The concentration of TCM199 that generates higher percentage of embryonic development was 36%, containing 2,2mM of glucose. When the concentration of amino acids in the culture medium was evaluated, it was observed that the embryos beginning to require higher concentrations of amino acids during the stage of blastocyst. Also, it was determined that the culture media volumes have no effect on embryonic development.

Key words: IVF, spermatid capacitation, Percoll, swim up, embryonic development.